

Zelluläre Wirkung, Wirkmechanismen und Nachweisverfahren von Schilddrüsenhormonen und ihren Metaboliten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Master of Science Trophologin

Ina Lehmphul

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Fakultät für Lebenswissenschaften

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Werner Kloas
2. Prof. Dr. Josef Köhrle
3. Prof. Dr. Jens Mittag

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
Zusammenfassung	XII
Abstract	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Die Schilddrüse	1
1.2 Schilddrüsenhormone (TH)	1
1.2.1 Biosynthese	1
1.2.2 Freisetzung und Transport	3
1.3 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT)	4
1.4 Schilddrüsenhormonmetabolismus	4
1.4.1 Schilddrüsenhormonmetabolismus durch Deiodasen	4
1.4.2 Alternativer TH Metabolismus	6
1.4.3 Lokale und systemische Wirkungen des aktiven TH T_3	7
1.5 Wichtige TH-Metabolite – 3,5- T_2	9
1.5.1 Lokale und systemische Effekte von 3,5- T_2	9
1.5.2 Transport im Serum und in Zielzellen	10
1.5.3 TH-Metabolit Rezeptoren	10
1.5.4 Nachweismethoden für 3,5- T_2	11
1.6 Wichtige TH-Metabolite – 3- T_1 AM	12
1.6.1 Lokale und systemische Effekte von 3- T_1 AM	12
1.6.2 Transport im Serum und in die Zielzelle	13
1.6.3 TH-Metabolit-Rezeptoren	13
1.6.4 Nachweismethoden des Metaboliten	14
1.7 Wichtige TH-Metabolite – TA_1 – 3-Thyroessigsäure	14
2. Zielsetzung der Arbeit	17
2.1 Nachweisverfahren für Schilddrüsenhormonmetabolite	17
2.2 Wirkung von Schilddrüsenhormonmetaboliten im Zellkulturmodell	17
3. Material	18
3.1 Chemikalien	18
3.2 Geräte	18

3.3 Verbrauchsmaterialien.....	18
3.3.1 Reagenz-Kits	18
3.3.2 Puffer und Lösungen	19
3.4 Datenbanken	20
3.5 Software	20
4. Methoden.....	23
4.1 Molekularbiologische Methoden	23
4.1.1 RNA-Isolierung mit Trizol.....	23
4.1.2 cDNA Synthese	23
4.1.3 qPCR	24
4.1.4 Primer	25
4.2 Proteinbiochemische Methoden.....	28
4.2.1 Bradford-Prinzip	28
4.2.2 Bradford-Durchführung.....	28
4.3 Zellkultur.....	29
4.3.1 Murine pankreatische MIN6-Zelllinie.....	29
4.3.2 Humane hepatozelluläre HepG2-Zelllinie	29
4.4 Zytotoxizitäts-/Zellviabilitäts-Assays	29
4.4.1 MTT Assay – NADPH-abhängiger Zelltoxizitäts-Assay.....	29
4.4.1 a) Prinzip des Assays.....	29
4.4.1 b) Durchführung	30
4.4.2 ATP-Zellviabilitätsassay	30
4.4.2 a) Prinzip des Assays.....	30
4.4.2 b) Durchführung	30
4.5 Zelluläre Aufnahme / Zelloberflächenbindung von 3-T ₁ AM	30
4.6 Extraktion der MIN6-Zellen für die LC-MS/MS Analyse	31
4.7 Extraktion der MIN6-Zellkulturüberstände für die LC-MS/MS Analyse	32
4.8 LC-MS/MS Parameter.....	32
4.8.1 AbSciex 4000 - Analyse Zellkultur-Zelllysate	32
4.8.2 AbSciex 6500 – Analyse Zellkulturüberstände	34
4.9 Glukose-stimulierte Insulin-Sekretion (GSIS)	36
4.10 Analyse Substrat-spezifischer Energieumsatz mit Seahorse XF Bioanalyzer	36
4.10.1 Prinzip der Messung	36
4.10.1 a) Mitochondriale Atmung	37
4.10.1 b) Glykolyse / Substratverstoffwechslung.....	39

4.11 Immunoassay 3,5-T ₂	40
4.11.1 Spezielle Reagenzien und Apparaturen.....	40
4.11.2 Antikörper-Biotinylierung.....	41
4.11.3 Konjugation von 3,5-T ₂ an BSA und HRP.....	41
4.11.4 Produktion von monoklonalen Antikörpern spezifisch für 3,5-T ₂	43
4.11.5 Screening Verfahren für Maus Seren und Hybridoma Überstände	44
4.11.6 Bestimmen der Immunglobulin Subklasse und Aufreinigung der mAb	45
4.11.7 Ultrasensitiver Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA)	45
4.11.8 3,5-T ₂ Immunoassay-Validierung	46
4.11.9 Klinische Kollektive.....	46
4.11.10 Statistische Analysen.....	48
5. Ergebnisse	49
5.1 Glukoregulatorische Funktion von 3-T ₁ AM und seinen Metaboliten	49
5.1.1 Zytotoxizitäts-/Zellviabilitäts-Assay.....	49
5.1.2 Transporter- und Enzymexpression in MIN6 Zellen und pankreatischen Inselzellen der Maus.....	50
5.1.2 a) 3-T ₁ AM-Aufnahme	50
5.1.2.b) 3-T ₁ AM-Metabolismus.....	52
5.1.3 3-T ₁ AM-Aufnahme und intrazellulärer Metabolismus in MIN6-Zellen.....	53
5.1.4 3-T ₁ AM abhängige Glucose stimulierte Insulinsekretion.....	58
5.1.5 3-T ₁ AM und TA ₁ Wirkung an Mitochondrien und auf intrazelluläre Substratverwertung..	59
5.1.5 a) Versuchsaufbau - Seahorse Bioanalyzer XF96e.....	59
5.1.5 b) Vorversuch - Substanztitration	61
5.1.5 c) Mitochondriale Atmung	62
5.2 TH-stimulierter zellulärer Energiestoffwechsel von Hepatozyten	64
5.2.1 Versuchsaufbau - Seahorse Bioanalyzer XF24.....	64
5.2.2 Einfluss des 3,5-T ₂ s auf die mitochondriale Atmung und den zellulären Protonenfluss.....	64
5.2.3 Zelluläre 3,5-T ₂ -Aufnahme	67
5.3 Etablierung einer mAb-spezifischen Messmethode für 3,5-T ₂ im humanen Serum	68
5.3.1 Produktion von mAb spezifisch für 3,5-T ₂	68
5.3.2 Vorscreening.....	68
5.3.3 CLIA Optimierung	70
5.3.4 Spezifität des CLIA	73
5.3.5 Präzision und Zuverlässigkeit des Immunoassays	73
5.3.6 Stabilität des Analyten im Assay	75

5.3.7 Analyse humaner Seren Schilddrüsen-gesunder Probanden.....	75
5.3.8 Analyse humaner Patienten-Seren mit primären Schilddrüsenerkrankungen	75
5.3.9 Analyse humaner Patienten-Seren mit sekundärer Schilddrüsenerkrankung.....	78
6. Diskussion.....	81
6.1 Glukoregulatorische Funktion des 3-T ₁ AMs und seinen Metaboliten.....	81
6.1.1 Zelluläre Aufnahme von 3-T ₁ AM.....	81
6.1.1 a) potenzielle 3-T ₁ AM-Transporter	81
6.1.1 b) Hemmung der transporterabhängigen Thyronin-Aufnahme durch 3-T ₁ AM.....	82
6.1.1 c) Endozytose und GPCR-Bindung als Mechanismen der Aufnahme.....	83
6.1.2 Intrazellulärer Metabolismus und Konsequenzen für die Insulinsekretion	83
6.1.3 Wirkmechanismus – Plasmamembranbindung vs. zelluläre Aufnahme.....	85
6.1.4 Mitochondrien als 3-T ₁ AM Zielstruktur	86
6.1.5 Humanrelevanz	87
6.2 3,5-T ₂ -abhängige Aktivierung von Mitochondrien in Hepatozyten	88
6.2.1 Auswahl des Zellmodells	88
6.2.2 TH-Transport über die Plasmamembran.....	88
6.2.3 Wirkung an den Mitochondrien und weitere zelluläre Effekte von TH in HepG2 Zellen.....	88
6.3 Immunoassay	90
6.3.1 Etablierung und Validierung.....	90
6.2.1 a) Limitierungen des 3,5-T ₂ CLIA	90
6.3.2 Vergleich Immunoassay und LC-MS/MS	91
6.3.3 3-T ₁ AM als 3,5-T ₂ -Metabolit?	92
6.3.4 Referenzbereich für 3,5-T ₂ in einer euthyreoten Population	92
6.3.5 3,5-T ₂ im thyroidalen Erkrankungsbild.....	93
6.3.6 3,5-T ₂ im nicht-thyroidalen Erkrankungsbild	95
6.3.6 a) Chronisches NTI bei dialysepflichtigen Patienten mit Niereninsuffizienz (CKD).....	96
6.3.6 b) Akutes NTI in Patienten mit postoperativem atrialen Herzflimmern (POAF).....	98
7. Zusammenfassung und Ausblick	100
8. Referenzen	102
Eigene Publikationen.....	117
Danksagung	118
Eidesstattliche Erklärung.....	119

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
2-DG	2-Deoxyglukose
3-T ₁ AM	3-Iodthyronamin
AADC	aromatische L-Aminosäure Decarboxylase
Abb	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
Adra _{2α}	adrenerger Rezeptor 2alpha
ANO1	Anoctamin 1
AO	Aminoxidase
ApoB100	Apolipoprotein B100
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
Ct	<i>cycle of treshhold</i>
COX	Cytochrom C Oxidase
DC	Decarboxylase
Dehal	Dehalogenase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dio	Deiodase
DIT	3,5-Diiodtyrosin
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
DUOX	NADPH-anhängige Dual Oxidase
ECAR	<i>Extracellular Acidification Rate</i>

EDC	Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid
ELISA	enzymgekoppelter Immunoassay
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
EST	<i>expressed sequence tags</i>
FBS	fetales Rinderserum
FCCP	Carbonyl-Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
fT ₃ / fT ₄	freies / nicht-Protein gebundenes T ₃ / T ₄
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
fwd	<i>forward</i>
g	Beschleunigung
GaM Fc-Biotin	anti-Maus IgG, Fc-spezifisch und biotinyliert
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GSIS	Glukose-stimulierte Insulinsekretion
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HbA _{1c}	Glykohämoglobin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPT-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse
HRP	Meerrettichperoxidase
i.c.v.	<i>intracerebroventrikulär</i>
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
lpro	lproniazid
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
KRBH	Krebs-Ringer-HEPES Puffer
Lat / LAT	L-Typ Aminosäure Transporter
LCB	<i>low cross buffer</i>
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
m	milli
M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper

MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
Mct /MCT	Monocarboxylattransporter
min	Minute
MIN6	pankreatische β -Zelllinie Maus
MIT	3-Monoiodtyrosin
MTT	Tetrazoliumsalz
mRNA	<i>messenger</i> RNA
n	nano
NA	nicht analysiert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaN ₃	Natriumazid
ND	nicht detektiert
NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
NIS	Natrium-Jodid-Symporter
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NQ	nicht quantifiziert
ns	nicht signifikant
Ntcp / NTCP	<i>Na⁺-taurochlorate cotransporting polypeptide</i>
NTI	<i>non-thyroidal illness</i>
Oatp/OATP	organisches Anionen-Transportprotein
OCR	<i>Oxygen Consumption Rate</i>
ON	über Nacht
p	pico
pAb	polyklonaler Antikörper
PAI	Myelomazelllinie
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3-Kinase
POAF	postoperatives atriales (Herz)-flimmern
qPCR	quantitative Real-Time PCR

rev	<i>reverse</i>
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen / min
RQ	respiratorischer Quotient
rT ₃	reverse 3,3',5'-Triiod-L-Thyronin
s.c.	<i>subkutan</i>
SD	Schilddrüse
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SHIP	<i>Study of Health in Pomerania</i>
Slc / SLC	<i>solute carrier</i>
SULT	Sulfotransferase
T ₀	Thyronin
T ₁	3- / 3'-Thyronin
T ₂	3,5- / 3,3'- / 3',5'-Diiiod-L-Thyronin
T ₃	3,3',5-Triiod-L-Thyronin
T ₄	3,3',5,5'-Tetraiod-L-Thyronin / Thyroxin
TA	Thyroessigsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAM	Thyronamin
TAAR	<i>trace-amine associated receptor</i>
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TCA	Tricarbonsäure
Tg	Thyroglobulin
TH	Thyronin, Schilddrüsenhormon
TBME	tert-Butylmethylether
TPO	Thyreoperoxidase
TR α	Schilddrüsenhormonrezeptor alpha
TR β	Schilddrüsenhormonrezeptor beta
TRE	TH responsives Element
TRH	Thyrotropin-Releasing-Hormon
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
tT ₃ / tT ₄	totales / Protein gebundenes T ₃ / T ₄
TTR	Transthyretin

VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
Vol%	Volumenprozent

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schilddrüsenfollikel und schematische Übersicht der Schilddrüsenhormonbiosynthese.....	3
Abb. 2 Deiodase abhängige Bildung von T_3	4
Abb. 3 Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen Achse	5
Abb. 4 Netzwerk des Schilddrüsenhormon-Metabolismus	6
Abb. 5 Metabolismus von Schilddrüsenhormon-Verbindungen	7
Abb. 6 Chemische Strukturformel von Thyronin, Thyronamin und Thyro-Essigsäure.....	7
Abb. 7 Zielorgane für die Wirkung von $3,5-T_2$ und $3-T_1AM$	10
Abb. 8 $3,5-T_2$ und $3-T_1AM$ - entgegengesetzte Effekte auf den Energiestoffwechsel.....	11
Abb. 9 Enzymatischer Metabolismus von $3,5-T_2$ zu $3-T_1AM$	13
Abb. 10 Schematische Darstellung des $3-T_1AM$ -Metabolismus zur korrespondierenden Thyro- Essigsäure	16
Abb. 11 Schematische Darstellung.....	38
Abb. 12 Schematische Übersicht	39
Abb. 13 Schematische Übersicht	41
Abb. 14 Reaktionsschema zur Konjugation von $3,5-T_2$ an BSA.....	43
Abb. 15 Reaktionsschema zur Konjugation von $3,5-T_2$ an aldehyd-präaktivierte HRP	43
Abb. 16 Immunisierungsprotokoll.....	44
Abb. 17 Schematische Übersicht der Produktion von monoklonalen Antikörpern nach Köhler und Milstein.....	45
Abb. 18 Kombination zweier Screening-Assays um $3,5-T_2$ spezifische mAb von unspezifischen mAb zu unterscheiden.....	46
Abb. 19 Zytotoxizitäts- und Zellviabilitätstest.....	50
Abb. 20 Enzym- und Transporterexpression von MIN6 Zellen (links) und murinen Langerhansschen Inseln (rechts).....	52
Abb. 21 Repräsentatives Chromatogramm für $3-T_1AM$ und TA_1 in extrahierten MIN6-Zellen.....	54
Abb. 22 Kombiniertes $3-T_1AM$ Bindungs- und Aufnahmeassay.....	55
Abb. 23 $3-T_1AM$ abhängige Bildung von TA_1 in MIN6-Zellen	56
Abb. 24 Vergleichende Darstellung des intrazellulären Abbaus von $3-T_1AM$ und des Umsatzes zur korrespondierenden TA_1 in MIN6 Zellen	57
Abb. 25 LC-MS/MS Analyse des TA_1 -Exports aus MIN6-Zellen nach $3-T_1AM$ Exposition.....	58
Abb. 26 $3-T_1AM$ -LC-MS/MS Analyse von MIN6 Zellkulturüberständen	59
Abb. 27 $3-T_1AM$ -abhängige Glukose stimulierte Insulinsekretion.....	60
Abb. 28 Zelltitration MIN6 Zellen im Seahorse Bioanalyzer	61
Abb. 29 Titrationskurven Inhibitoren Mitochondrien.....	62

Abb. 30 3-T ₁ AM und TA ₁ abhängige ATP-Produktion der Mitochondrien in MIN6 Zellen.....	63
Abb. 31 3-T ₁ AM und TA ₁ abhängige maximale Atmung über basal der Mitochondrien in MIN6 Zellen	64
Abb. 32 Innere Mitochondrienmembran mit Elektronentransportkette	66
Abb. 33 Extrazelluläre Protonen-Akkumulation durch akute 3,5-T ₂ und T ₃ Stimulation	66
Abb. 34 Zelluläre Sauerstoffaufnahme nach akuter 3,5-T ₂ und T ₃ -Stimulation.....	67
Abb. 35 Real-time PCR Analyse der Transporter-Expression in Maus-Leber, primären Hepatozyten der Maus sowie zwei humanen Zelllinien HepG2 und HUH-7.....	68
Abb. 36 Serum Titer Test.....	69
Abb. 37 Schematische Darstellung des Hybridoma-Screenings.	70
Abb. 38 Prinzip des etablierten CLIA zur Detektion von 3,5-T ₂ im humanen Serum	72
Abb. 39 Immunoassay-Validierung	72
Abb. 40 3,5-T ₂ Serum Konzentrationen [nM] in Patienten mit der Initialdiagnose Hypo- oder Hyperthyreose.....	77
Abb. 41 3,5-T ₂ Serum Konzentrationen (nM) in Schilddrüsen-Krebs-Patienten	78
Abb. 42 Dialysepflichtige Patienten	79
Abb. 43 3,5-T ₂ Messungen im humanen Serum vor und nach Dialyse.....	80
Abb. 44 Patienten mit chronischer Nierenerkrankung	81
Abb. 45 Schematische Darstellung der 3-T ₁ AM Wirkung in MIN6-Zellen als pankreatisches β- Zellmodell	88
Abb. 46 Beteiligung des 3,5-T ₂ s an der Regulation der HPT-Achse	95
Abb. 47 Extrathyroidale 3,5-T ₂ -Bildung aus L-Thyroxin	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Allgemein verwendete Geräte	20
Tabelle 2 Allgemein verwendete Reagenzien-Kits.....	20
Tabelle 3 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	21
Tabelle 4 Benutzte Datenverwaltungssysteme	23
Tabelle 5 Benutzte Software	23
Tabelle 6 Zusammenfassung der untersuchten Gene und zugehörige Primerpaare in Zellkulturen und primären Zellen der Maus	26
Tabelle 7 Zusammenfassung der untersuchten Gene und zugehörige Primerpaare in humanen Zellkulturen.....	28
Tabelle 8 Standard-Reihe zur Bestimmung der zellulären Protein-Konzentration.....	29
Tabelle 9 Arbeitsparameter des Massenspektrometers zur Erfassung der Massenspektren von Mutter- und Tochterionen	34
Tabelle 10 Substanz-abhängige LC-MS/MS Parameter AbSciex 4000	34
Tabelle 11 HPLC-Gradient zur chromatographischen Trennung von TH, TAM und TA.	35
Tabelle 12 Arbeitsparameter des Massenspektrometers zur Erfassung der Massenspektren von Mutter- und Tochterionen	36
Tabelle 13 Substanz-abhängige LC-MS/MS Parameter AbSciex 6500	36
Tabelle 14 Beschreibung und Berechnung der mitochondrialen Funktionen	40
Tabelle 15 Transporter-Expressions-Analyse (in silico) im humanen (Hs.) und murinen (Mm.) Pankreas	52
Tabelle 16 Übersicht der verwendeten Versuchsbedingungen im Seahorse XF24 Bioanalyzer	65
Tabelle 17 Kreuzreaktivität	71
Tabelle 18 Zusammenfassung relativer CLIA-Kreuzreaktivitäten (%).....	73
Tabelle 19 3,5-T ₂ CLIA Inter- and Intra-Assay-Variationen	75
Tabelle 20 Assoziation von 3,5-T ₂ mit Biomarkern im Serum von euthyreoten SHIP-Probanden	94
Tabelle 21 TH-Parameter im Serum von Probanden ± POAF sowie ± NTI	99

Zusammenfassung

Schilddrüsenhormone (TH) regulieren Metabolismus und Energiestoffwechsel. Der TH-Metabolit (THM) 3,5-T₂ (3,5-Diiod-L-Thyronin) aktiviert Fett-Oxidation und mitochondriale Atmung. Der THM 3-Iodothyronamin (3-T₁AM) beeinflusst zusätzlich glukoregulatorische Prozesse. THM können zur Reduktion von Körperfett beitragen.

Um 3,5-T₂ im humanen Serum nachzuweisen sollte ein Immunoassay aufgebaut, validiert und angewendet werden. In intakten hepatozellulären (HepG2) sowie pankreatischen β -Zellen (MIN6) sollte untersucht werden ob THM durch Modulation der mitochondrialen Aktivität die zelluläre Substratverstoffwechslung (3,5-T₂) und Insulinsekretion (3-T₁AM) regulieren können.

Der Immunoassay ist sensitiv, spezifisch und misst zuverlässig 3,5-T₂ im humanen Serum. Hyper- und Hypothyreose zeigen vergleichbare 3,5-T₂ Konzentrationen, jedoch akkumuliert 3,5-T₂ bei sekundären Erkrankungen der Schilddrüse und athyreoten Patienten unter Thyroxin-Supplementation. In HepG2-Zellen konnte die Aktivierung der mitochondrialen Atmung durch 3,3',5-Triiod-L-Thyronin (T₃), jedoch nicht durch 3,5-T₂ stimuliert werden. Die Expression von TH-transporters (THT) war gering verglichen mit Maus-Hepatozyten. MIN6 exprimiert THT vergleichbar mit Langerhansschen Inselzellen der Maus. 3-T₁AM wird in die Zelle aufgenommen, zu 3-Iodothyroessigsäure (TA₁) metabolisiert, und wieder exportiert. Nach 3-T₁AM Gabe ist die mitochondriale ATP-Produktion sowie die Glukose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) vermindert.

3,5-T₂ zirkuliert in euthyreoten Individuen, ist nicht an der zentralen Regulation der TH-Achse beteiligt, wird extrathyroidal gebildet und niedrige T₃-Werte können durch erhöhtes 3,5-T₂ erklärt werden. HepG2 erwies sich als ungeeignetes Zellmodell, da wenige THT vorhanden sind, 3,5-T₂ die Plasmamembran wahrscheinlich nicht passieren kann und damit die Aktivierung der Mitochondrien aus bleibt. In MIN6 wurde gezeigt, dass die GSIS nicht ausschließlich an der Plasmamembran durch 3-T₁AM reguliert wird.

Schlagwörter: Schilddrüsenhormon, Schilddrüsenhormon-Metabolit, 3,5-Diiod-L-Thyronin, 3-Iodothyronamin, 3,3',5-Triiod-L-Thyronin, Mitochondrium, Immunoassay, Leber, Pankreas, beta-Zelle

Abstract

Thyroid hormones (TH) regulate metabolism and energy metabolism. The TH-metabolite (THM) 3,5-T₂ (3,5-diiodo-L-thyronine) activates fat oxidation and mitochondrial respiration. The THM 3-T₁AM (3-iodothyronamine) influences in addition glucoregulatory processes. THM may support reduction in body fat mass.

It was the idea to establish, validate and apply an immunoassay to determine 3,5-T₂ in human serum. Using intact hepatocellular (HepG2) as well as pancreatic β -cells (MIN6) it should be tested if THM can modulate mitochondrial activity, resulting in increased cellular substrate usage (3,5-T₂) as well as decreased insulin secretion (3-T₁AM).

The established immunoassay is sensitive, specific and detects precisely 3,5-T₂ in human serum. Hyper- and hypothyroidism shows similar 3,5-T₂ concentrations, although 3,5-T₂ accumulates in secondary thyroidal illness as well as in athyreotic patients under thyroxine-supplementation. Using HepG2 cells, mitochondrial respiration was stimulated by 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T₃), but 3,5-T₂ had no effect. Expression of TH-transporters (THT) was low compared to murine hepatocytes. In contrast, MIN6 express THT comparable to murine Langerhans islets. 3-T₁AM is taken up by the cell, metabolized to 3-iodothyroacetic acid (TA₁) and following export. After 3-T₁AM application mitochondrial ATP-production as well as glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) was reduced.

3,5-T₂ circulates in euthyroid individuals, is not involved in central regulation of TH-axis, is produced extrathyroidally and low T₃ values can be explained by increased 3,5-T₂. HepG2 was shown to be an inappropriate cellmodel, because THT are merely expressed, suggesting that 3,5-T₂ is not able to pass the plasma membrane, thereby preventing mitochondrial activation. In addition, it was shown in MIN6 cells, that GSIS is not exclusively regulated at the plasma membrane level via 3-T₁AM.

1. Einleitung

1.1 Die Schilddrüse

Die Schilddrüse (SD) ist ein endokrines Organ, dessen Aufgabe die Synthese, Speicherung und Freisetzung von Schilddrüsenhormonen (TH) ist. Im gesunden erwachsenen Menschen besteht die SD aus paarigen Lappen, die sich unterhalb des Schildknorpels an die Luftröhre anlegen. Beide Lappen werden an ihren Polen über den Isthmus verbunden. Im Menschen, jedoch nicht in der Maus, überspannt dieser vertikal die Trachea. Mikroskopisch bilden die SD-Follikel die funktionellen Einheiten der Schilddrüse, die sich aus einschichtigen polarisierten Thyrozyten zusammensetzen (siehe Abb. 1). Das Epithel der Thyrozyten ist kugelförmig in unterschiedlich großen Follikeln angeordnet und umschließt im Lumen-Inneren des Follikels das homogene und leicht azidophile Kolloid. Dieses besteht hauptsächlich aus Thyroglobulin (Tg), ein Glykoprotein reich an Tyrosinresten, an dem die Synthese von Schilddrüsenhormonen stattfindet. Zwischen den Follikeln, assoziiert mit den Thyrozyten findet man die Kalzitonin-bildenden C-Zellen (parafollikuläre Zellen). Der interfollikuläre Raum ist mit Bindegewebe ausgekleidet. Die SD-Follikel sind zusätzlich von einem weit verzweigten Netzwerk an Blutgefäßen, Lymphkanälen und Nervenfasern umspannt. Die Thyrozyten selbst werden darüber versorgt und produzierte TH sowie Jodid können darüber transportiert werden. Die Schilddrüsenlappen werden nach aussen hin durch eine Bindegewebskapsel von umliegenden Geweben abgegrenzt.

1.2 Schilddrüsenhormone (TH)

Die SD kann, bei guter Versorgung bis zu 10 mg Jodid für die Synthese von TH anreichern. Die SD produziert Jod-haltige TH sowie deren Vorstufen, wohingegen der Abbau und Metabolismus der TH vorwiegend in der Peripherie stattfindet.

1.2.1 Biosynthese

Für die Synthese von TH müssen dem Organismus zuerst einmal Jodid und andere jodhaltige Verbindungen mit der Nahrung zugeführt werden. Diese werden im Dünndarm resorbiert, gelangen in die Blutzirkulation und Jodid wird gegen ein Konzentrationsgefälle energieabhängig durch den Natrium-Jodid-Symporter (NIS, SCL5A5) basolateral über die Zellmembran des Thyrozyten transportiert (1, 2). NIS transportiert Jodid, aufgrund des Na^+/K^+ -ATPase abhängigen Natriumgradienten, der über die Membran angelegt ist, zusammen mit zwei Natriumionen in den Thyrozyten (siehe Abb. 1). Das Jodid wird im Thyrozyten zur apikalen Zellmembran transportiert und über den dort lokal vorhandenen Ionen-Kanal Pendrin (SLC26A4) und/oder den Ionenkanal Anoctamin 1 (3) in das Follikel-Lumen abgegeben (4, 5). Das Jodid wird anschließend oxidiert und in Tyrosylreste des Thyroglobulins als organische Jodverbindung eingebaut. Die Jodierung der

Tyrosylreste findet an der apikalen Membran statt. Die NADPH-abhängigen Dual Oxidasen (DUOX1/2) produzieren H_2O_2 an der apikalen Membran (6, 7). Die Thyreoperoxidase (TPO) oxidiert Jodid mit H_2O_2 zum reaktiven Intermediat Jodonium-Ion. Dieses wird sofort organisch gebunden von Tyrosinresten des Tg, so dass 3-Monoiodtyrosin (MIT) und 3,5-Diiodtyrosin (DIT) als Vorläufer der TH entstehen. Ebenfalls TPO-abhängig werden DIT mit DIT zu 3,3',5,5'-Tetraiod-L-Thyronin (T_4 , Thyroxin) oder in geringerem Umfang MIT und DIT zu 3,3',5-Triiod-L-Thyronin (T_3) am Tg kombiniert (8). T_3 wird in größerem Umfang durch intra- oder extrathyroidale 5'-Deiodierung aus T_4 gebildet. Nicht benötigtes MIT und DIT wird nach deren proteolytischer Freisetzung von Tg im Thyrozyten durch Jodotyrosin Dehalogenasen (Dehal1) dehalogeniert und das Jodid wird so rückgewonnen und steht der Biosynthese wieder zur Verfügung (9).

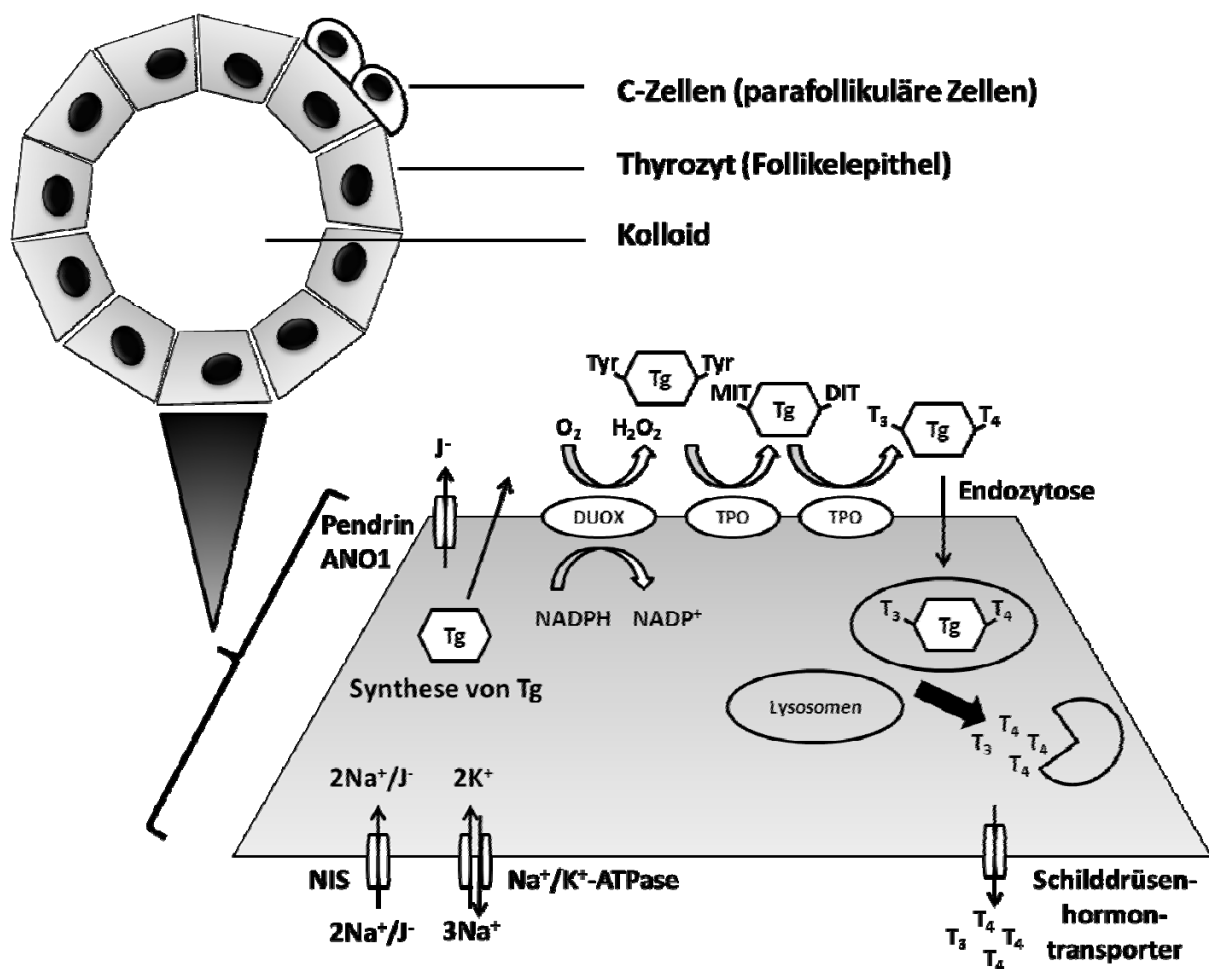


Abb. 1 Schilddrüsenfollikel und schematische Übersicht der Schilddrüsenhormonbiosynthese

Jodid wird über den Transporter NIS in den Thyrozyten aufgenommen, hindurch transportiert und auf der apikalen Seite über Pendrin und/oder Anoctamin 1 (ANO1) in das Follikellumen abgegeben. Thyroglobulin (Tg) wird im Thyrozyten selbst synthetisiert, ins Follikellumen abgegeben und dort H_2O_2 -abhängig an Tyrosinresten durch TPO jodiert. Tg gebundenes MIT und DIT werden durch TPO zu T_3 und T_4 gekoppelt und das TH-haltige Tg anschließend im Kolloid des Follikels gespeichert. Bei Bedarf wird das gespeicherte Tg per Endozytose in den Thyrozyten wieder aufgenommen und die Schilddrüsenhormone werden lysosomal freigesetzt. Basolaterale Schilddrüsenhormontransporter geben diese an die Blutzirkulation ab.

1.2.2 Freisetzung und Transport

Die Freisetzung von TH ist an die Bedürfnisse des Organismus angepasst und wird durch die TH selbst über die Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen-Achse reguliert (siehe dazu 1.3). Nach erfolgter Jodierung und Kopplung der Tyrosylreste wird das TH-haltige Tg im Kolloid Lumen bis zur Freisetzung der TH gespeichert. Für die proteolytische Freisetzung von TH wird das Kolloid internalisiert (Endozytose), das TH-haltige Tg durch Pinozytose im Epithel eingeschlossen und in den Thyrozyten aufgenommen (siehe Abb. 1). Cathepsine sind an der Tg-Degradation beteiligt (10). Anschließend verschmelzen die Vesikel mit Lysosomen, wobei es zu einer Cathepsin-vermittelten Proteolyse von TH aus Tg kommt (11). Abschliessend werden die TH über die basale Zellmembran transportervermittelt an die Blutzirkulation abgegeben, an Transportproteine gebunden und an ihren Bestimmungsort gebracht (siehe Abb. 1). T_4 ist zu 99,9% an seine Bindungsproteine (Thyroxin-bindendes Globulin (TBG), Transthyretin (TTR) sowie Albumin) gebunden. Die totalen T_4 (tT_4) Konzentrationen (70 - 150 nM) sind im humanen Serum circa 60-fach höher im Vergleich zu T_3 (1-3 nM). Dieser Unterschied wird dadurch kompensiert, dass T_3 eine verringerte Affinität zu Bindungsproteinen aufweist. Lediglich 0.03 % T_4 liegt im humanen Serum frei vor, wohingegen 0.3 % T_3 ungebunden ist (12). Für die Wirkung von TH an den entsprechenden Zielorganen steht nur der freie Anteil TH zur Verfügung (13, 14).

Da TH geladene Aminosäurederivate sind benötigen sie Transportproteine um die Zellmembran passieren zu können. Aufgrund struktureller Eigenschaften lag es nahe, dass Aminosäuretransporter den TH-Transport vermitteln. Eine ganze Reihe TH-Transporter wurden beschrieben. Jene mit hoher Affinität/Spezifität sind der Monocarboxylattransporter 8 (MCT8, SLC16A2) (15), MCT10 (SLC16a10) (16), die L-Typ Aminosäure Transporter (LAT1/2, SLC7A5 und SLC7A8) (17), und das organische Anionen-Transport-Polypeptid (OATP) (18).

Als klassische TH werden jene bezeichnet die von der SD selbst sezerniert werden. Das sind vor allem die geladenen Aminosäurederivate Thyroxin (3,3',5,5'-Tetraiodo-L-thyronin, T_4) sowie T_3 (3,3',5-Triiodo-L-thyronin; siehe Abb. 2). Deren Vorläufer und insbesondere Metabolite sind wichtige jodhaltige Verbindungen im Organismus. TH sind in Vertebraten bis hin zu Cnidariern und Chordatieren vorhanden (19) und in jeder Spezies uniform.

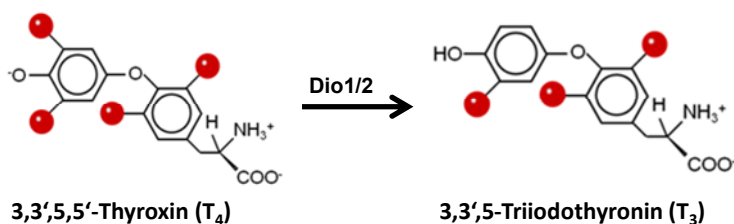


Abb. 2 Deiodase abhängige Bildung von T_3

T_4 wird von der Schilddrüse sezerniert und extrathyroidal durch Deiodasen in den Zielorganen zu T_3 aktiviert.

1.3 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT)

Die Biosynthese, Speicherung und Freisetzung von TH aus der SD wird durch die Hormone der HPT-Achse reguliert (siehe Abb. 3). Dies geschieht durch die kontrollierte pulsatile Sekretion des Neuropeptides Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) aus dem Hypothalamus. TRH gelangt über den Portalkreislauf des Hypophysenstiels in die Hypophyse. Dort stimuliert es im Vorderlappen die thyreotropen Zellen zur Bildung und Freisetzung vom Thyroidea-stimulierenden Hormon (TSH). TSH selbst gelangt über die Zirkulation zur SD und bindet dort an die vorhandenen TSH-Rezeptoren an der basolateralen Membran der Thyrozyten. Die TSH-vermittelte Aktivierung des TSH-Rezeptors regt in den Thyrozyten selbst die Produktion von Tg an, fördert dessen Jodierung sowie die anschließende Freisetzung aus dem Kolloid, Pinozytose und Lyse des TH-haltigen Tg mit abschließender Freisetzung der TH. Die TH-Bildung und Freisetzung wird zentral reguliert und bestimmt die TH-Konzentrationen in der Zirkulation. Umgekehrt wirken die ausgeschütteten TH als negative Rückkopplung und hemmen die TRH- und TSH-Ausschüttung selbst. Durch den Eingriff an zwei Punkten der HPT-Achse regulieren TH ihre Verfügbarkeit und Sekretion selbst.

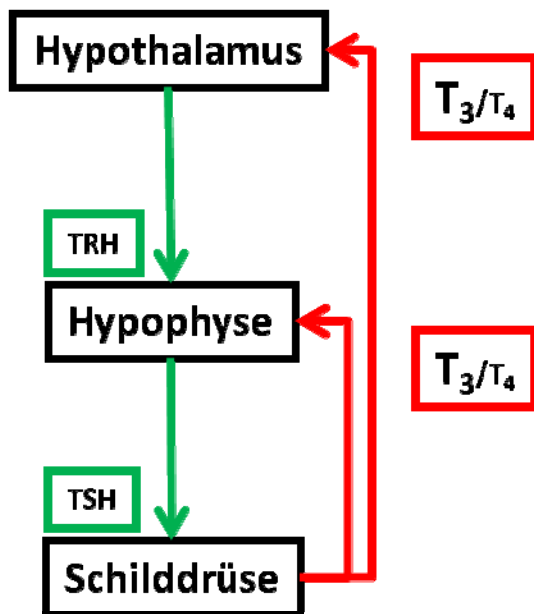


Abb. 3 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse

Im Hypothalamus wird TRH produziert und wirkt nach Freigabe positiv (grün) auf die Bildung von TSH in der Hypophyse. Das freigesetzte TSH stimuliert wiederum die Produktion von Schilddrüsenhormonen in der Schilddrüse. Die Freisetzung von T₃ und T₄ sowie die periphere Bildung von T₃ regulieren die Produktion von TRH und TSH (rot, negative Rückkopplung).

1.4 Schilddrüsenhormonmetabolismus

1.4.1 Schilddrüsenhormonmetabolismus durch Deiodasen

Der TH-Metabolismus ist notwendig um TH zu aktivieren oder inaktivieren um damit die Wirkung sowie die Verfügbarkeit der TH zu regulieren.

Die SD synthetisiert zum überwiegenden Anteil T_4 , was in die Zirkulation abgegeben wird, die Zielzellen erreicht und über TH-Transporter aufgenommen wird, jedoch selbst inaktiv ist und nicht am TH-Rezeptor (TR) wirksam wird. Im Menschen werden lediglich 20% des zirkulierenden aktiven TH T_3 direkt von der SD ausgeschüttet (20) und von TH-Transportern in die Zielzellen aufgenommen um am TR seine Wirkung zu entfalten. Der Großteil des T_3 wird intrazellulär durch den enzymatischen Umsatz durch Deiodasen zur Verfügung gestellt (siehe Abb. 3). Für den Metabolismus von TH sind drei Selenoenzyme, die Deiodasen 1, 2, 3 (Dio1-3), verantwortlich, wobei jede eine unterschiedliche Gewebeexpression, physiologische Funktion und Substrat-Spezifität aufweist (21-25). Es erfolgt eine reduktive Monodejodierung, wobei ein Jod-Atom gegen ein Wasserstoffatom ausgetauscht wird (siehe Abb. 3). Die Aktivierung von T_4 zu T_3 erfolgt in Abhängigkeit des Gewebes und der dort vorherrschenden Expression von Dio1 oder Dio2 (5'-Dejodierung). Die Inaktivierung von T_4 zu r(verse) T_3 ($3,3',5'-T_3$) kann von Dio1 sowie Dio3 erfolgen (5-Dejodierung). Es ist noch nicht eindeutig geklärt welche Bedingungen vorliegen müssen, damit die Dio1 eine Aktivierung oder Inaktivierung von T_4 begünstigt. Die Ausschüttung von rT_3 aus der Schilddrüse ist vernachlässigbar gering (26). T_3 und rT_3 können durch weitere Dejodierung zu verschiedenen Diiodthyroninen ($3,5-T_2$, $3,3'-T_2$ und $3',5'-T_2$) umgesetzt werden (siehe Abb. 4). Insbesondere auf die Funktion von $3,5-T_2$ im Energiestoffwechsel wird später noch ausführlicher eingegangen. Ob der Umsatz zu den entsprechenden T_2 eine weitere Inaktivierung, Intermediat-Bildung oder Aktivierung darstellt ist nicht eindeutig geklärt. Durch weitere Dejodierung entstehen Monoiodthyronine ($3-T_1$ und $3'-T_1$) sowie jodfreies Thyronin (T_0) als weitere Abbauprodukte. DIT und MIT selbst sind keine Substrate für Dios (27).

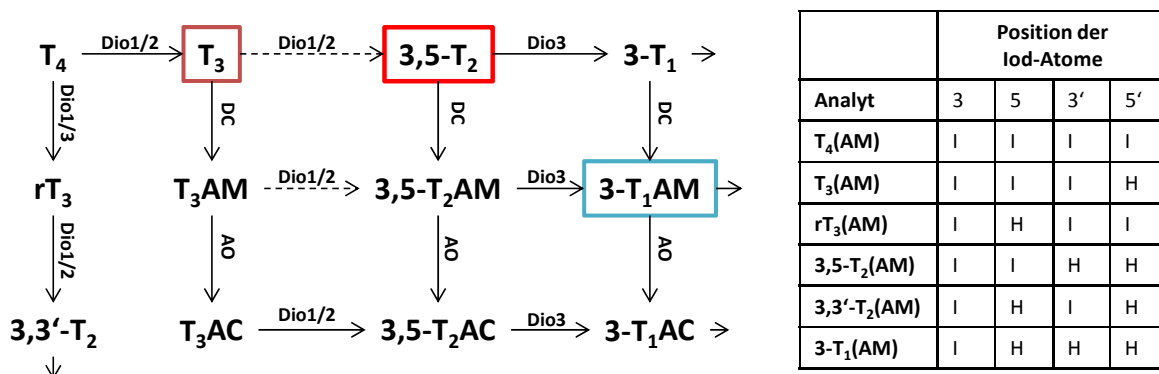


Abb. 4 Netzwerk des Schilddrüsenhormon-Metabolismus

Im Netzwerk inbegriffen sind Thyronine (T), Thyronamine (TAM) und Thyro-Essigsäuren (TAC). Die Metabolite entstehen durch enzymatische Umsetzung von Deiodasen (Dio1-3), Decarboxylasen (DC) und Aminoxidasen (AO). Pfeile die nicht durchgängig sind zeigen an, dass der Stoffwechselweg noch nicht bewiesen ist. Pfeile am Rand ohne Enzymbeschriftung weisen darauf hin, dass die Metabolite weiter umgesetzt werden können (Netzwerk stellt einen Auszug dar). T_3 und $3,5-T_2$ sind als ‚hot‘ und $3-T_1AM$ als ‚cold‘ TH mit Wirkungen auf den Energiestoffwechsel gekennzeichnet. Rechts in der Abbildung eine Übersicht der Iod-Atom-Positionen für die dargestellten TH und deren Metabolite.

1.4.2 Alternativer TH Metabolismus

Die Deiodierung ist für den Abbau von >70 % des von der SD sezernierten T_4 verantwortlich. Ca. 30% werden in alternativen Stoffwechselwegen umgesetzt (28). Wie in Abb. 5 dargestellt, sind darin inbegriffen Modifizierungen an der Seitenkette (oxidative Deaminierung und Decarboxylierung), Konjugatbildungen (Sulfatierung und Glucuronidierungen) sowie Bindungsspaltung (Spaltung der Etherbindung) (29-31).

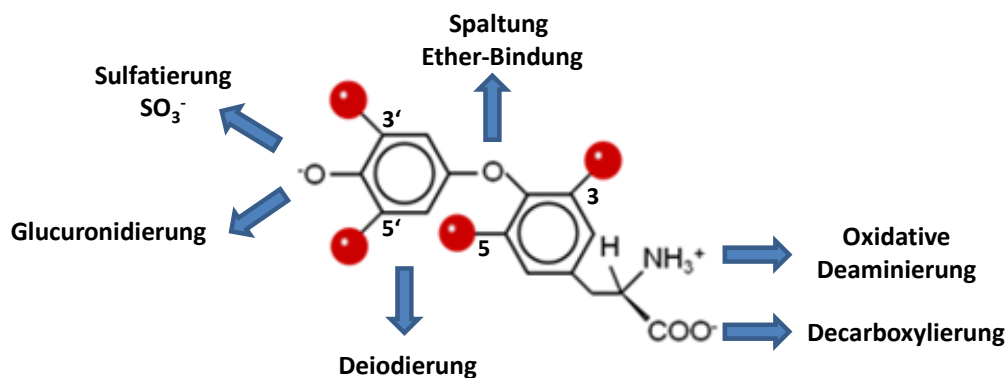


Abb. 5 Metabolismus von Schilddrüsenhormon-Verbindungen

Schilddrüsenhormone können an der Alanin-Seitenkette decarboxyliert oder deaminiert werden. Rote Kugeln repräsentieren Iod-Atome in vier Positionen an zwei Phenylringen. Sie können durch Deiodasen entfernt werden. Die Hydroxyl-Gruppe des phenolischen Rings kann mit Sulfaten oder Glucuroniden konjugiert werden. Des Weiteren kann die Etherbindung enzymatisch gespalten werden.

Die Seitenketten aller im Abschnitt 1.4.1 zuvor genannten Thyronine (siehe Abb. 6) können Substrate für Decarboxylasen sein, wodurch Thyronamine (TAM) entstehen (32-34). TAM sind eine neue Klasse von biologisch aktiven TH-Metaboliten (35-37). Sie sind von Relevanz, da TAM unter anderem Effekte entgegengesetzt zu T_3 aufweisen und damit den klassischen TH entgegenwirken (siehe Review (35)). TAMs sind wiederum Substrate für Dios (38), Sulfotransferasen (SULT, (39)) sowie für Aminoxygenasen (Mao, Ssao) (36, 40). Insbesondere auf das 3-Iodothyronamin (3- T_1 AM) und seine zelluläre Wirkung soll im weiteren Verlauf der Arbeit näher eingegangen werden. Die Decarboxylase, welche zur Entstehung des 3- T_1 AMs beiträgt ist bis jetzt nicht bekannt. Allerdings konnte die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) als Enzym ausgeschlossen werden (41).

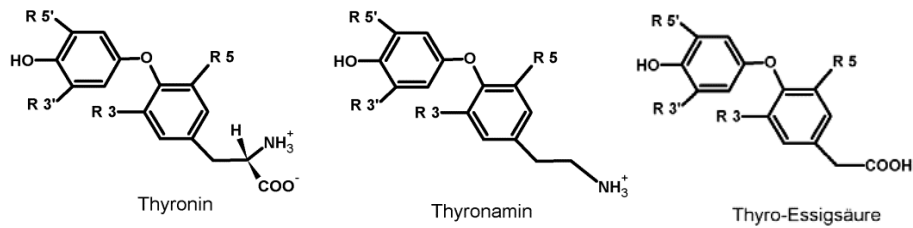


Abb. 6 Chemische Strukturformel von Thyronin, Thyronamin und Thyro-Essigsäure

Durch Decarboxylierung der Alanin-Seitenkette wird aus dem Thyronin ein Thyronamin. Weiterer enzymatischer Umbau der Seitenkette durch Monoaminoxidasen führt zur Bildung der Thyro-Essigsäure. R 3/3'/5/5' bezeichnen verschiedene Positionen für Iod-Atome. In Abhängigkeit von der Enzymexpression in verschiedenen Geweben sowie gebundenen Iod-Atomen an den Substanzen kommt es zu unterschiedlichen Umsatzraten.

Thyronamine können nach erfolgter Decarboxylierung weiter an der Seitenkette (siehe Abb. 5) verstoffwechselt werden durch Monoaminoxidasen (Mao) so dass durch oxidative Desamidierung die entsprechenden Thyroessigsäuren entstehen (TA, siehe Abb. 6). In wie weit die TAs in die Regulation der TH Effekte eingreifen können oder diese regulieren ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt. Es gibt allerdings aus ersten veröffentlichten Daten Vermutungen, dass ein Teil der 3-T₁AM Effekte durch die Bildung von TA₁ erklärt werden können (42).

Im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus sind TH ebenfalls Substrate für Sulfotransferasen und Glucuronidasen (siehe Abb. 5). Diese Konjugationen an Position 4' des phenolischen Ringes tragen dazu bei, dass die Substanz durch Intermediat-Bildung für die weitere Umsetzung in der Phase II des Fremdstoffmetabolismus aktiviert wird (Sulfo-Konjugat) und weiter inaktiviert / metabolisiert wird. Die Mengen an Sulfo-TH im Plasma, in der Galle und im Urin sind unter physiologischen Bedingungen sehr gering, da diese Konjugate vermehrt durch die Dio1 umgesetzt werden. Die Glucuronidierung vermindert dagegen die Membrangängigkeit von TH womit deren biliäre Ausscheidung begünstigt wird. Ein Teil der TH-Konjugate wird durch intestinale bakterielle Hydrolyse wieder frei gesetzt, reabsorbiert und über den enterohepatischen Kreislauf dem Organismus wieder zur Verfügung gestellt (29, 31).

Die Spaltung von Etherbindungen innerhalb von TH sei der Vollständigkeit halber genannt (siehe Abb. 5), spielt sie doch in gesunden Individuen eine untergeordnete Rolle (31, 43, 44). Durch diese Peroxidase-abhängige Reaktion wird DIT in Patienten mit Sepsis vermehrt freigesetzt, was möglicherweise die bakterielle Aktivität beeinflusst (45, 46). Das durch die Reaktion freigesetzte Iod ist oxidiert und bindet reaktionsfreudig an Proteine zur Bildung von Iodproteinen (47).

1.4.3 Lokale und systemische Wirkungen des aktiven TH T₃

Nachdem T₃ über TH-Transporter in die Zelle aufgenommen ist, bindet es an nukleäre Rezeptoren, den TH-Rezeptor α und β (TR α und TR β) und reguliert spezifische Gene in den Zielzellen des

Organismus (48). TR α und TR β sind auf unterschiedlichen Genen lokalisiert und fungieren als Hormon-modulierbare Transkriptionsfaktoren, deren Expression in verschiedenen Geweben und über verschiedene Entwicklungsstadien hinweg weit verbreitet ist. Der TR bindet T₃ hochaffin und interagiert des Weiteren mit TH responsiven Elementen (TRE) im Promotorbereich von TH-sensitiven Genen der DNA. In Abhängigkeit von der TRE Struktur kann es zur Ligand-abhängigen oder -unabhängigen Aktivierung sowie zur Inaktivierung der Zielgen-Expression kommen (49). Bis jetzt ist die Bindung von T₃ als aktives TH an TR ausführlich untersucht worden, neuere Untersuchungen legen ausserdem nahe, dass T₄ an der TR Oberfläche bindet (50, 51). In wie weit die Bindung von T₄ Auswirkungen auf die T₃ vermittelte Regulation des TR hat, muss noch weiter untersucht werden. Reguliert wird die Wirkung von TH an TRs durch die lokale Verfügbarkeit von vorwiegend T₃, die zelluläre Aufnahme von T₃ und T₄ sowie durch den zellulären aktivierenden oder inaktivierenden Metabolismus von T₄. Die wichtigsten Zielgewebe sind das Zentralnervensystem, weißes und braunes Fettgewebe, Knochen, Skelettmuskel, Leber, Darm und das Herz-Kreislauf-System. TH regulieren Metabolismus, Energiestoffwechsel, Sauerstoffaufnahme, Knochenwachstum und Entwicklung. T₃ steigert die kardiale Aktivität, aktiviert Fettgewebe, stimuliert die Leberfunktion und die Gehirnentwicklung (12).

Ein Großteil der T₃ Effekte sind, wie zuvor beschrieben, nukleäre, TR vermittelte Effekte welche die Transkription von Zielgenen verändern. Dieser Teil der T₃ vermittelten Wirkung wird als klassisch genomisch bezeichnet. Das Konzept der T₃ Wirkung wurde in der Zwischenzeit allerdings um Plasmamembran-vermittelte, nicht-genomische Effekte erweitert (51, 52). Sie werden abhängig oder unabhängig von der Ligandbindung an den TR initiiert, können, müssen aber nicht im Verlauf des Signalweges in der Nukleus-vermittelten Zell-Antwort münden. Zum einen gibt es nicht-genomische TR-abhängige Signalwege. Dabei werden TH TH-Transporter-vermittelt in die Zielzelle aufgenommen und binden an zytosolisch-ständige TR. Diese können dann funktional mit Kinase-aktivierten Signalwegen wie MAPK (Mitogen-aktivierte Protein Kinase), ERK1/2 (Extrazellulär regulierte Kinase), PI3K (Phosphatidyl-inositol 3-Kinase) oder Src Kinase interagieren (Review (52)). Im Mittelpunkt von TR-unabhängigen Signalwegen stehen Plasmamembranrezeptoren an welche TH binden. TH Transport über die Plasmamembran ist dafür nicht notwendig. Das TH-klassische Beispiel dafür ist der $\alpha\beta3$ Integrin-Rezeptor der nach TH Stimulation Zellwachstum, -proliferation und Angiogenese initiiert ((53), (54), (55)). In diesem Kontext sind auch Wirkungen für T₄ und weitere TH-Metabolite beschrieben, worauf aber an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll.

1.5 Wichtige TH-Metabolite – 3,5-T₂

Die erste Beschreibung von 3,5-T₂ in der wissenschaftlichen Literatur war 1933 (56), gefolgt von einigen wenigen Untersuchungen in den 60er Jahren. Seit 1978 ist dieser TH-Metabolit kontinuierlich Gegenstand der Forschung.

Der TH-Metabolit 3,5-T₂ ist eine potente thyromimetische Substanz, die extratyroidal gebildet wurde und sowohl Langzeit- als auch Kurzzeiteffekte hat. 3,5-T₂ aktiviert den Energiestoffwechsel, im Speziellen durch eine erhöhte Fett-Oxidation, zelluläre Atmung und mitochondriale Aktivität (empfohlene Reviews (57, 58)). Wichtige Zielorgane für die Wirkung von 3,5-T₂ sind Leber, Muskel, Herz, weißes und braunes Fettgewebe (siehe Abb. 7).

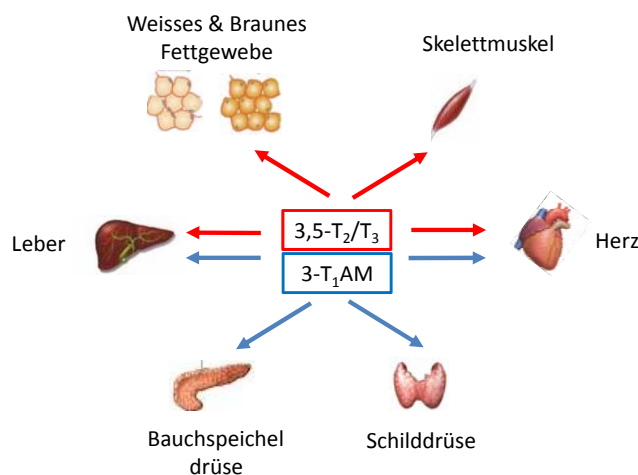


Abb. 7 Zielorgane für die 3,5-T₂- und 3-T₁AM-Wirkung

Beide Metabolite haben teilweise gleiche Zielorgane (Leber und Herz). Andere Organe wie Muskel und Fettgewebe sind alleiniges Ziel der 3,5-T₂ Wirkung, 3-T₁AM wirkt zusätzlich auf Pankreas und die Schilddrüse selbst.

1.5.1 Lokale und systemische Effekte von 3,5-T₂

Untersuchungen zu den zellulären Mechanismen und Zielstrukturen von 3,5-T₂ wurden *in vivo* überwiegend in hypothyreoten Ratten sowie in zellulären und mitochondrialen *in vitro* Modellen durchgeführt (Zusammenfassung siehe Abb. 8). 3,5-T₂ verursacht eine Reduktion von Körperfett durch einen gesteigerten Energieumsatz (59, 60) beugt Insulin-Resistenz vor (61, 62), zeigt schon nach kurzer Zeit ausgeprägte anti-steatotische Effekte (63-65) und metabolische Aktivierung (60, 66) nach Applikation von pharmakologischen Dosen in überwiegend hypothyreoten Nager-Modellen, zwei Probanden (67) und einem hepatischen *in vitro* Zellmodell (68, 69). Dass 3,5-T₂ die Sauerstoff-Aufnahme stimulieren kann wurde *in vitro* an perfundierten Lebern (70), Leberhomogenat (71) oder 3,5-T₂ vorbehandelten und sofort isolierten Leber-Mitochondrien von hypothyreoten Ratten gezeigt (72). 3,5-T₂ steigert die Oxidative Kapazität (Cytochrom C Oxidase Aktivität; COX) und die mitochondriale Atmung in Ratten-Lebern ohne nennenswerten Effekt auf mitochondriale Masse oder Proteingehalt (71, 73). COX stellt eine direkte Bindungsstelle für 3,5-T₂, bereit, durch dessen Bindung die allosterische Inhibition der Atmung durch ATP unterbunden wird (74, 75). Der zugrunde

liegende Mechanismus ist eine partielle Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (76) und eine intrinsische Entkopplung der COX bei erhöhtem Membranpotenzial (77, 78). Zuletzt wurde gezeigt, dass nach chronischer Behandlung von hypothyreoten Ratten die Expression und Aktivität der hepatischen mitochondrialen $F_{(0)}F_{(1)}$ -ATP Synthase erhöht war (79, 80). Diese Experimente erklären teilweise die Effekte von 3,5- T_2 auf die basale metabolische Rate /Atmung.

Neben den zuvor beschriebenen mitochondrialen Effekten sind ausserdem weitere schnelle Effekte beschrieben, wobei die Regulation von Protonen-Pumpen (81, 82), Ca^{2+} - Signalwege (83) sowie Phosphorylierung von Kinasen (60) eine Rolle spielt.

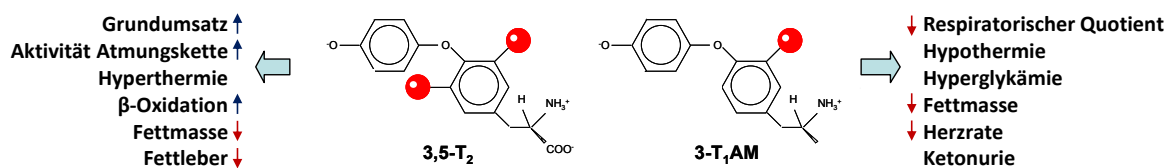


Abb. 8 3,5- T_2 und 3- T_1 AM - entgegengesetzte Effekte auf den Energiestoffwechsel

3,5- T_2 steigert den Energieumsatz, vergleichbar mit T_3 , aber es treten weniger unerwünschte zentrale und kardiovaskuläre Nebenwirkungen auf. Dagegen verursacht 3- T_1 AM nach pharmakologischer Applikation im Tiermodell vorwiegend eine metabolische Depression.

1.5.2 Transport im Serum und in Zielzellen

Zum Transport des 3,5- T_2 s im Serum und in der Zelle sowie über den Transmembrantransport ist bis jetzt wenig bekannt. Ein Bindungsprotein im Serum ist direkt nicht beschrieben. Dabei ist ausserdem unklar ob es ein Bindungsprotein gibt, was noch nicht identifiziert wurde oder ob 3,5- T_2 überwiegend frei in der Zirkulation vorkommt. Intrazellulär konnte ein 38 kDa großes zytosolisches Bindungsprotein für 3,5- T_2 nachgewiesen werden (84). Dieses wurde aber nicht weiter untersucht, charakterisiert oder benannt. Es ist bis jetzt ebenfalls unklar welcher Transporter 3,5- T_2 über die Plasmamembran transportiert, damit es seine intrazelluläre Wirkung im Zytosol und an den Mitochondrien erfüllen kann. In einem Nebensatz wurde in einer Publikation lediglich festgehalten, dass 3,5- T_2 den T_3 -Transport durch MCT10 am wirkungsvollsten inhibieren kann (85). Ein direkter Nachweis fehlt bis jetzt.

1.5.3 TH-Metabolit Rezeptoren

Dieser endogene TH Metabolit 3,5- T_2 zeigt überwiegend nicht-klassische thyromimetische Effekte (67). Unerwünschte Nebenwirkungen des T_3 s auf Herzgewicht, Herzrate und auf die HPT, die durch klassische T_3 -modulierte TH-Rezeptoren vermittelt werden (48), könnten bei vergleichbaren 3,5- T_2 -Konzentrationen vermieden werden. Im Vergleich zu T_3 ist eine ca. 50-80-fache 3,5- T_2 -Konzentration notwendig um TRs zu aktivieren. Lediglich ein paar Publikationen sind vorhanden zum Thema genomische TH-Rezeptor vermittelte Effekte von 3,5- T_2 , wobei 3,5- T_2 in hohen Dosen chronisch

verabreicht wurde um selektive thyromimetische Effekte *in vitro* und *in vivo* (80, 86-88) zu provozieren. Im Killifisch konnte als weitere Spezies nachgewiesen werden, dass 3,5-T₂ ein alternativer Ligand für TRβ1 ist (89). Die Applikation von 3,5-T₂ in Dosen, die vergleichbar mit therapeutischen T₄-Gaben bei thyroidektomierten Patienten sind, werden seit Jahren als mögliche pharmakologische Behandlung von Adipositas postuliert, aber auch immer wieder kritisch in Frage gestellt.

1.5.4 Nachweismethoden für 3,5-T₂

Bevor eine therapeutische 3,5-T₂-Applikation in pharmakologischen Dosen überhaupt denkbar ist muss die physiologische Relevanz durch Messung endogener 3,5-T₂-Spiegel im Serum und Geweben etabliert und durchgeführt werden.

Der erste Radioimmunoassay (RIA) (1978) zur Messung von 3,5-T₂ in 2 ml angereichertem humanen Serum sowie Schilddrüsengewebe basierte auf polyklonalen Antiseren (90). Die 3,5-T₂-Biosynthese *in vivo* scheint unabhängig von der SD selbst zu sein, da der 3,5-T₂-Gehalt im Thyroglobulin lediglich 0.07% des gebundenen T₄s entspricht (91). In kurzer Zeit folgten vergleichbare RIAs (91-96). Alle nutzten [¹²⁵I]-markiertes 3,5-T₂, ausser Meinhold *et al.* ([³H]Acetyl-3,5-T₂) und Pinna *et al.* (3-Br-5-[¹²⁵I]-T₁). Die detektierte 3,5-T₂-Konzentration in euthyreoten Probanden variiert zwischen den verschiedenen RIAs extrem zwischen 0,01 nM (92) und 0,19 nM (94). Dieser 18-fache Unterschied in der detektierten Konzentration macht es schwer die verschiedenen Methoden zu vergleichen oder gar eine Aussage zum 3,5-T₂-Referenzbereich zu treffen. Faber *et al.* konnten als Erste zeigen, dass ca. 15 % von i.v. appliziertem T₃ extrathyroidal zu 3,5-T₂ in euthyreoten Probanden umgewandelt wurde (93). T₃ Injektion in euthyreote Ratten resultierte in einem 5-fachen Anstieg von 3,5-T₂ in der Zirkulation nach 12 h (97), was die These unterstützt, dass T₃ die Vorläufersubstanz von 3,5-T₂ ist, was jedoch noch nicht *in vitro* bewiesen werden konnte. Zusätzlich zum direkten Nachweis der 3'-Deiodierung des T₃s zu 3,5-T₂ sind ausserdem das Gewebe sowie die involvierten Enzyme unbekannt und konnten *in vitro* bis jetzt nicht charakterisiert werden (98). Ein nicht zu vernachlässigender Grund dafür ist das Fehlen einer sensitiven und verlässlichen analytischen Flüssigkeitschromatographie gekoppelten Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) und/oder diagnostischen antikörperbasierten Messmethode für den Nachweis von 3,5-T₂. Leider ist heutzutage keines der damals verwendeten Antiseren mehr verfügbar, da sie entweder aufgebraucht wurden oder die darin enthaltenen Antikörper nicht mehr aktiv sind. Zusätzlich dazu ist bis jetzt keine LC-MS/MS Methode publiziert, mit der endogenes 3,5-T₂ im Serum oder Gewebe gemessen werden könnte (99, 100).

1.6 Wichtige TH-Metabolite – 3-T₁AM

Thyronamine (TAM) sind eine neue Klasse von Signalmetaboliten, die den Energiehaushalt beeinflussen können. TAMs wurden bereits 1960/1990 synthetisiert, wurden aber erst später intensiv erforscht (37, 101). Strukturell sind TAM Thyronine, denen die Carboxylgruppe in der Alaninseitenkette fehlt. Die Kombination aus Deiodierung (Dio1-3) und Decarboxylierung (Enzym unbekannt) bringt vergleichbar zu TH neun verschiedene TAMs hervor, die sich alle in der Position ihrer Iod-Atome unterscheiden (siehe Abb. 4 und 6). Von den neun möglichen TAMs ließen sich mit LC-MS/MS aber nur zwei (3-T₁AM und T₀AM) *in vivo* im Serum und Gewebe verschiedener Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Hamster, Schwein) nachweisen (36, 37, 102, 103). Es wird vermutet, dass die Vorläufer-Substanz für 3-T₁AM 3,5-T₂ ist und weitere Deiodierung zu T₀AM führt (siehe Abb. 9). Dass es einen Zusammenhang zwischen 3,5-T₂ und 3-T₁AM gibt, beziehungsweise wo die Umwandlung stattfindet konnte bis jetzt aber weder *in vivo* noch *in vitro* nachgewiesen werden.

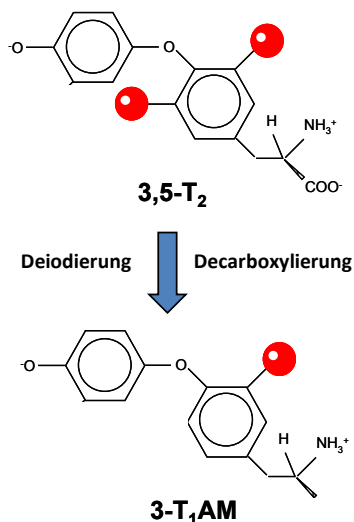


Abb. 9 Enzymatischer Metabolismus von 3,5-T₂ zu 3-T₁AM

3,5-T₂ ist eine mögliche Vorläufer-Substanz von 3-T₁AM. Die Decarboxylase welche 3,5-T₂ zu 3,5-T₂AM umsetzt ist bis jetzt nicht bekannt. Beide Metabolite sind in der Zirkulation nachweisbar.

1.6.1 Lokale und systemische Effekte von 3-T₁AM

3-T₁AM zeigt entgegengesetzte Effekte zu T₃ und 3,5-T₂ (Review (35)) und wird deswegen als biologisch aktiver ‚kalter‘ Metabolit bezeichnet (siehe Abb. 8). In Tiermodellen induziert eine einmalige pharmakologische Dosis (50 mg/kg Körpergewicht) eine verringerte körperliche Aktivität (37, 104), Hypothermie (37), verringerte Herzrate und Herzzeitvolumen (105, 106). 3-T₁AM verursacht des Weiteren eine Verringerung des Respiratorischen Quotienten (RQ), was eine metabolische Änderung von Kohlenhydrat- zu Fettstoffwechsel bedeutet (102). Dadurch kommt es zu einer Abnahme des Körperfetts. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte mit NMR-basierten Metabolit-Profilen und Atem-Studien, dass die chronische Gabe von 3-T₁AM zu einer raschen

Fettmobilisation führt und nach ein paar Tagen durch einen Proteinabbau begleitet ist (107). Metabolischer Umsatz sowie Sauerstoff-Verbrauch sind unter 3-T₁AM Einfluss vermindert, wobei die F₍₀₎/F₍₁₎-ATPase (108) und der Komplex III der mitochondrialen Atmungskette (109) als direkte Zielstrukturen für 3-T₁AM an den Mitochondrien identifiziert wurden. Ausserdem beeinflusst 3-T₁AM glucoregulatorische Prozesse, die zu Hypoinsulinämie, Hyperglykämie und Hyperglukagonämie führen (42, 110, 111). In einer kleinen klinischen Studie (n=20) konnte eine direkte Korrelation von 3-T₁AM und Glykohämoglobin (HbA_{1c}) sowie eine signifikant erhöhte 3-T₁AM-Serumkonzentration in diabetischen Patienten nachgewiesen werden (112). Den Effekten von 3-T₁AM auf die Glukosehomeostase wird deswegen eine physiologische und pathophysiologische Relevanz zugeschrieben.

Unter akuter Applikation von 3-T₁AM waren TSH sowie die TH T₃ und T₄ im Serum vermindert, was darauf hin deutet, dass 3-T₁AM die Feedbackregulation an der HPT-Achse stören könnte (110, 111). Bei intrazerebroventrikulärer (i.c.v.)- 3-T₁AM-Gabe konnte lokal im Gehirn allerdings keine Veränderung der T₃ und T₄ Konzentrationen festgestellt werden (113). Die bevorzugten Gewebe in denen 3-T₁AM nach Applikation akkumuliert und wirkt sind Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe (114), siehe Abb. 7. Es zeigte sich ausserdem, dass 3-T₁AM in Geweben, wie Herz, Leber, Niere, Skelettmuskel und Magen stärker angereichert war als T₃ und T₄ (36, 112).

1.6.2 Transport im Serum und in die Zielzelle

3-T₁AM präferiert im Gegensatz zu den klassischen TH Apolipoprotein B100 (ApoB100) als bislang einziges nachgewiesenes Bindungsprotein. Soweit bisher bekannt werden ca. 90% des 3-T₁AM nicht-kovalent an ApoB100 gebunden (115). ApoB100 ist vor allem in VLDL und LDL präsent und fungiert als Ligand für den LDL-Rezeptor, welcher hauptsächlich dafür verantwortlich ist LDL aus dem Plasma zu entfernen. Gleichzeitig stellt die rezeptorvermittelte LDL -Endozytose einen Mechanismus für die zelluläre 3-T₁AM Aufnahme in die Zielzelle dar.

Erstaunlicherweise ist 3-T₁AM kein Substrat für die TH-Transporter MCT8 und MCT10 (37, 85, 116). Parallel wurde ein groß angelegter Screening Versuch innerhalb der Solute Carrier Familie (SLC) unternommen um mögliche 3-T₁AM-Transporter zu identifizieren. Es konnte kein einzelner Transporter für 3-T₁AM festgelegt werden, jedoch kamen mehrere Kandidaten in Frage. Es bleibt weiterhin offen ob 3-T₁AM durch ein Netzwerk von Transportern in die Zelle aufgenommen wird, die unabhängig von den Ionen Na²⁺ und Cl⁻ agieren aber pH-Wert abhängig sind (85, 116).

1.6.3 TH-Metabolit-Rezeptoren

Das schnelle Auftreten metabolischer Effekte nach 3-T₁AM-Applikation ist klassisch für nicht-genomische Effekte. 3-T₁AM kann nukleäre TRs nicht aktivieren (37) und es wurde bis jetzt kein weiterer nukleärer Rezeptor beschrieben, der durch 3-T₁AM aktiviert wird. Seine Wirkungen

entfaltet dieser Metabolit durch Bindung an membranständige Rezeptoren. Zum Einen kann 3-T₁AM an den Trace-amine associated receptor 1 (TAAR1) binden und intrazellulär die Adenylatzyklase (AC) Aktivität beeinflussen. Diese Interaktion ist möglich aber nicht bis ins Ende schlüssig, da gezeigt werden konnte, dass die Hypothermie nach 3-T₁AM Gabe in TAAR1 knockout Mäusen in gleichem Ausmaß vorhanden war wie in den Wildtyp-Kontrolltieren (117). Die Interaktion des 3-T₁AMs mit anderen Mitgliedern der TAAR-Familie sowie Speziesunterschiede werden weiterhin beforscht. Ein zweiter Rezeptor, der 3-T₁AM Effekte vermitteln soll, ist der α_{2A} adrenerge Rezeptor (Adra_{2 α}). Er ist in vielen verschiedenen Zelltypen vorhanden und interagiert mit inhibitorischen G-Proteinen (G_iPCR). Er ist unter anderem in pankreatischen β -Zellen vorhanden und es konnte gezeigt werden, dass in Adra_{2 α} knockout Tieren die 3-T₁AM abhängigen Effekte auf den Glukose- und Insulinstoffwechsel nicht mehr vorhanden waren (110).

1.6.4 Nachweismethoden des Metaboliten

Genauso wie für den Nachweis von 3,5-T₂ gibt es für die Analytik von 3-T₁AM einerseits LC-MS/MS basierte und andererseits Antikörper-basierte Detektionsversuche, mit denen 3-T₁AM bereits in Blut und Gewebe von Mensch, Maus und Ratte nachgewiesen werden konnte (36, 37, 103, 118). Die Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden ist jedoch fraglich. Die nachgewiesenen 3-T₁AM-Konzentrationen im Serum reichen von ‚nicht detektierbar‘ (119), hinein in den picomolaren (10⁻¹²) Bereich (36, 42, 112, 118) und bis zu nanomolaren Konzentrationen (102) – jeweils in Abhängigkeit der verwendeten präanalytischen Extraktionsmethoden. Dies macht es erheblich schwer aus der Literatur vergleichende Rückschlüsse aus unterschiedlichen Publikationen zu ziehen. Zusätzlich zu den verschiedensten analytischen Methoden ist eine antikörperbasierte unabhängige Nachweismethode für humanes Serum entwickelt worden (103). Die publizierten Serum-Konzentrationen sind im nanomolaren Bereich. Nachfolgepublikationen sind noch ausstehend.

1.7 Wichtige TH-Metabolite – TA₁ – 3-Thyroessigsäure

3-T₁AM unterliegt nach *in vivo* Applikation einem raschen und weitreichenden Metabolismus. Dieser beinhaltet neben Sulfatierung (O-Sulfonat-3-T₁AM), Acetylierung (N-Acetyl-3-T₁AM) und Glucuronidierung (3-T₁AM-Glucuronat) auch die oxidative Desaminierung zu 3-Iodothyro-Essigsäure (TA₁, siehe Abb. 10) (40, 120). All diese Metabolite konnten im Serum von Mäusen nach 3-T₁AM-Gabe (i.p.) nachgewiesen werden und waren in größeren Mengen vorhanden als das nicht-modifizierte 3-T₁AM selbst (120). Der Metabolismus von 3-T₁AM senkt die biologische Verfügbarkeit in der Zirkulation und in den entsprechenden Zielgeweben. Es ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt ob 3-T₁AM oder dessen Metabolite metabolisch aktiv sind.

Im Weiteren soll speziell auf TA₁ eingegangen werden. Der Umsatz von 3-T₁AM durch Monoaminoxidasen (Mao) zu TA₁ *in vivo* wurde erstmals 2009 beschrieben (40). TA₁ hat eine vergleichbare Gewebeverteilung wie 3-T₁AM (Leber, Niere, Herz, BAT, WAT), ist aber im Gehirn nur minimal nachzuweisen (120). Daten aus Zellkultur und *in vivo* Experimenten zeigen nicht immer den gleichen Metabolismus von 3-T₁AM. TA₁ wird als 3-T₁AM-Metabolit in H9c2 Kardiomyozyten nachgewiesen, ist in der gleichen Publikation jedoch nicht im murinen Herzen nachweisbar (36). In HepG2-Zellen ist der hauptsächliche 3-T₁AM-Metabolit TA₁, in 3-T₁AM-perfundierten Lebern entsteht allerdings T₀AM (121). Es wurde ausserdem gezeigt, dass 3-T₁AM in FRTL5 Zellen (SD-Zellen) aufgenommen und unter anderem zu TA₁ umgesetzt wird (122). Eine regulatorische Funktion an der Schilddrüse direkt kann nicht ausgeschlossen werden.

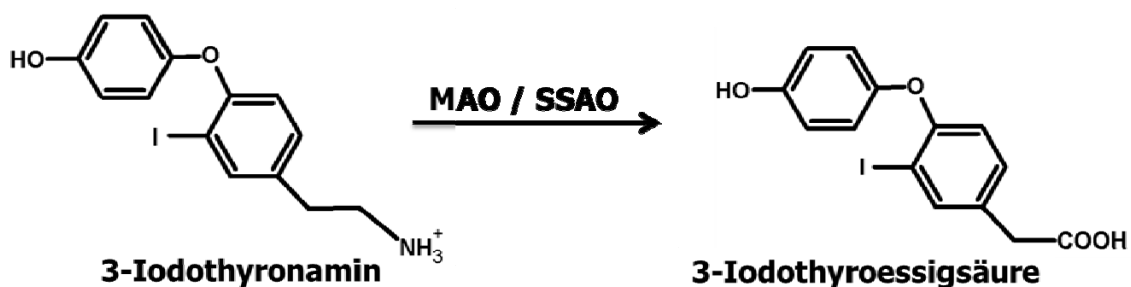


Abb. 10 Schematische Darstellung des 3-T₁AM-Metabolismus zur korrespondierenden Thyro-Essigsäure

Die Seitenkette des 3-T₁AM wird durch Monoaminoxidase A oder B (MaoA/B) zusammen mit der Semicarbazid-sensitiven Aminoxidase gewebespezifisch zur Essigsäure mit gleicher Anzahl an Iodatomen umgesetzt.

Um jene Effekte des 3-T₁AM von denen der TA₁ zu unterscheiden werden eine Reihe von spezifischen und unspezifischen Mao-Inhibitoren eingesetzt. Iproniazid ist ein nicht selektiver Aminoxidase-Inhibitor, Pargylin und Chlorgylin hemmen MaoA und MaoB, Aminoguanidin sowie Semicarbazid hemmen spezifisch die Ssao. Unter der Voraussetzung dass MaoA, MaoB und Ssao exprimiert und aktiv sind kann die Desaminierung von 3-T₁AM zu TA₁ durch Iproniazid vollständig unterdrückt werden, nicht jedoch durch Pargylin oder Semicarbazid (36, 123). Bei Verwendung von Mao-Inhibitoren zeigte sich, dass eine Reihe von 3-T₁AM-Effekten nicht mehr nachweisbar waren. Die hepatische Glukoseproduktion in HepG2-Zellen nach 3-T₁AM-Exposition (1 µM) konnte bei Iproniazid Anwesenheit nicht mehr stimuliert werden. Direkte Inkubation mit TA₁ hatte allerdings auch keinen Effekt (121). 3-T₁AM-abhängige Hyperglykämie, Reduktion der freien T₃-Werte, Verbesserungen der Lernkapazität sowie verminderte Schmerzsensitivität gegen heiße Stimuli konnten bei Chlorgylingabe nicht mehr nachgewiesen werden oder waren signifikant verändert (42, 113). TA₁ direkt wurde aber in diesem Zusammenhang nicht getestet. Es kann daher nur vermutet werden, dass TA₁ einen Teil der 3-T₁AM-Effekte verursacht. Dabei ist weiterhin unklar ob der intrazelluläre Metabolismus zu TA₁ notwendig ist und 3-T₁AM als Shuttle dient. Für TA₁ ist kein

Transportmechanismus in die Zielzelle bekannt und auch die Aktivierung von Plasmamembranrezeptoren muss noch untersucht werden.

2. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation sollten zwei Themengebiete bearbeitet werden:

2.1 Nachweisverfahren für Schilddrüsenhormonmetabolite

Wie ausführlich in der Einleitung erläutert sind bereits HPLC-MS/MS basierte Messmethoden für 3-T₁AM und dessen Metabolite im Serum und Gewebe etabliert und finden breite Anwendung für immer neue Fragestellungen. Im Rahmen Ihrer Dissertation entwickelte Frau Dr. Carolin Höfig ausserdem einen Immunoassay zur Detektion von 3-T₁AM im humanen Serum, der auf einem monoklonalen Antikörper basiert. Im Gegensatz dazu gibt es keine verlässliche Methode für den Nachweis von 3,5-T₂ mittels HPLC-MS/MS oder einem Immunoassay. Parallel zum bereits vorhandenen 3-T₁AM-Immunoassay sollte im Rahmen dieser Dissertation ein monoklonaler Antikörper für die spezifische Detektion von 3,5-T₂ hergestellt und ein Immunoassay zur Detektion dieses Metaboliten im humanen Serum entwickelt, validiert und angewendet werden. Ziel in der Anwendung war die Etablierung eines Referenzbereiches und die Untersuchung der Rolle von 3,5-T₂ in primären sowie sekundären Schilddrüsenerkrankungen. Die parallele Bestimmung von 3,5-T₂ und 3-T₁AM in geeigneten Kollektiven sollte dazu beitragen Zusammenhänge zwischen beiden Metaboliten herzustellen.

2.2 Wirkung von Schilddrüsenhormonmetaboliten im Zellkulturmodell

Die TH-Metabolite 3,5-T₂ und 3-T₁AM sind an der Feinregulation des Energiehaushaltes beteiligt. In intakten Zellsystemen sollte die zelluläre Aufnahme, der intrazelluläre Metabolismus, die Modulation von intrazellulären Signalwegen sowie die Regulation der mitochondrialen Aktivität untersucht werden. Dabei ist das Hauptsächliche und am Besten untersuchte 3,5-T₂-Zielorgan die Leber. Im Hepatozyten werden Substratverstoffwechslung und mitochondriale Aktivität von 3,5-T₂ beeinflusst. Untersuchungen dazu wurden überwiegend an Leberhomogenaten oder isolierten Mitochondrien *ex vivo* gemacht. Die zelluläre Integrität des Modells ist damit nicht gegeben. In dieser Dissertation sollte untersucht werden, wie und ob 3,5-T₂ den zellulären Energiestoffwechsel intakter hepatozellulärer Systeme beeinflussen kann. Dies beinhaltet Bindung, die transporterabhängige Aufnahme in die Zelle, Transport durch das Zytosol und nach Erreichen der Mitochondrien deren Aktivierung. Um die mitochondriale Atmung in intakten Zellen zu untersuchen sollten Messungen mit dem Seahorse Bioanalyzer etabliert werden und Anwendung finden. Die Mitochondrien als zentrales subzelluläres Kompartiment sind nicht nur Angriffspunkt für 3,5-T₂ sondern auch für 3-T₁AM, wobei zuletzt genannter Metabolit jedoch die mitochondriale ATP-Produktion hemmt. Da 3-T₁AM schnelle glukoregulatorische Wirkungen entfaltet, sollte exemplarisch an pankreatischen β -Zellen getestet werden, ob 3-T₁AM durch ein nicht bekanntes Transportsystem aufgenommen wird und eine 3-

T₁AM-abhängige Verringerung der mitochondrialen Aktivität zu einer gesenkten Insulinsekretion beiträgt.

3. Material

3.1 Chemikalien

Alle in den beschriebenen Versuchen verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders verzeichnet, in dem höchst verfügbaren Reinheitsgrad bei folgenden Firmen erworben: Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Perkin Elmer (Waltham, MA, USA), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva Feinbiochemikalien (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim), Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) und VWR International (Hannover).

Folgende TH und TH-Metabolite wurden von der Firma „formula“ (Berlin) bezogen: T₀, 3-T₁, 3'-T₁, 3,3'-T₂, 3,5-T₂, 3',5'-T₂, T₃, T₃AM, rT₃, rT₃AM, T₄, T₄AM, Tetrac, Triac, Diac. Weitere Substanzen wurden von Thomas S. Scanlan, OHSU, Portland, USA zur Verfügung gestellt: T₀AM, 3-T₁AM, ²H₄-3-T₁AM, 3'-T₁AM, 3,3'-T₂AM, ¹⁵N-3,5-T₂, 3,5-T₂AM, 3',5'-T₂AM, TA₁, TA₀. Weitere Interne Standards ¹³C₆-T₄, ¹³C₆-T₃, ¹³C₆-rT₃ und ¹³C₆-3,3'-T₂ wurden von der Firma Isoscience LLC (King of Prussia, PA, USA) erworben.

Alle Diiodo-L-Thyronine, alle verwendeten Internen Standards und die verwendeten Thyronamine wurden in reinem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. T₀, T₁, T₃ sowie T₄AM wurden in DMSO mit 100 µM Salzsäure gelöst. T₄ wurde in DMSO mit 100 µM Ammoniumhydroxid gelöst. Alle Substanzen wurden als 10 mM Stocklösung angesetzt und für die jeweiligen Experimente im Versuchspuffer oder Zellkulturmedium verdünnt. DMSO-Konzentrationen im Versuch waren ≤ 0,1 %.

3.2 Geräte

In Tabelle 1 sind allgemeine Geräte der täglichen Laborarbeit aufgelistet. Spezielle Geräte finden Erwähnung in den einzelnen Methodenteilen.

3.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien des täglichen Laborbedarfs wurden, wenn nicht gesondert angegeben, bei den folgenden Herstellern bezogen: A. Hartenstein (Würzburg), B. Braun Biotech International (München), Becton Dickinson (Heidelberg), Bio-Rad Laboratories (München), Invitrogen (Karlsruhe), Merck Biosciences (Schwalbach), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), peqLab Biotechnologie (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim), TPP (Trasadingen, Schweiz) und VWR (Hannover).

3.3.1 Reagenz-Kits

In Tabelle 2 sind alle Reagenzien-Kits aufgeführt, die käuflich erworben wurden.

3.3.2 Puffer und Lösungen

In Tabelle 3 sind alle Pufferlösungen angegeben, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 1 Allgemein verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Varioklav	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
DELTA Plateshaker	PerkinElmer (Rodgau-Jügesheim)
Elektrophoresekammer horizontal	Bio-Rad Laboratories (München)
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Heracell Inkubator	Heraeus (Hanau)
iCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories (München)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Magnetrührer Modell L32	A. Hartenstein (Würzburg)
Mastercycler® gradient	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowelle M501	Whirlpool (Schorndorf)
Mithras LB 940 Luminometer	Berthold Technologies (Bad Wildbach)
Netzgerät BluePower PLUS	SERVA (Heidelberg)
Netzgerät EPS 601 Power Supply	Amersham Biosciences (Freiburg)
pH-Meter inoLab Benchtop	WTW (Weilheim)
Pipetten Eppendorf research 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Finnpipette elektronisch 8-Kanal, 100-1200 µl	Thermo Scientific (Waltham, MA USA)
Pipette Discovery Comfort 8-Kanal, 50-300 µl	HTL Lab Solutions (Warschau, Polen)
Pipettierhilfe acu-jet pro	A. Hartenstein (Würzburg)
Photometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Plattenwascher Hydroflex	Tecan (Crailsheim)
Tissue Lyser	Qiagen (Hilden)
Ultraschallstab Labsonic M	B. Braun Biotech (Melsungen)
Ultra-Turrax T18	IKA (Staufen)
UV-Transilluminator V-90 M	Benda (Weisloch)
Vortex	A. Hartenstein (Würzburg)
Waage CP 2201	Sartorius (Göttingen)

Tabelle 2 Allgemein verwendete Reagenzien-Kits

Reagenz-Kit	Hersteller
Absolute qPCR SYBR Green Mix	Abgene (Epsom, UK)
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories (München)
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega (Madison, WI, USA)
RQ1 RNase-freie DNase	Promega (Madison, WI, USA)
ImmunoPure MAb isotyping Kit	Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA)
Insulin (Maus) ultrasensitive ELISA	DRG diagnostics (Marburg)
iScript Select cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (München)
LowCross Puffer	Candor Biosciences (Wangen)
Pierce™ Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
PIERCE EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
PIERCE SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
RIA rT₃	ZenTech S.A. (Belgien)
Sepharose-r-Protein A	GE Healthcare (Freiburg)
Slide-A-Lyzer Dialysekassetten 2K MWCO	Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA)
ThermoScript Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Trizol	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

3.4 Datenbanken

Tabelle 4 zeigt alle verwendeten Datenverwaltungssysteme.

3.5 Software

Tabelle 5 fasst die in dieser Arbeit verwendete Software zusammen.

Tabelle 3 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

Name des Puffers	Zusammensetzung
Homogenisationspuffer	250 mM D (+) Sucrose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA in H ₂ O, pH 7,4, Lagerung bei 4 °C
Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRBH)	119 mM NaCl, 4,74 mM KCl, 1,19 mM KH ₂ PO ₄ , 25 mM NaHCO ₃ , 2,54 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 1,19 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 10 mM HEPES; 10x Stocklösungen Lagerung -20°C
Lysis-Puffer	99,4 ml DMSO, 0,6 ml Essigsäure (100%), 10 g SDS, Lagerung bei RT
DNA-Analyse	
1x TAE Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA in ddH ₂ O, pH 8,3, Lagerung bei RT
6x DNA Ladepuffer	0,25 % (v/v) gesättigte flüssige Bromphenolblau-Lösung, 30 % Glycerol in ddH ₂ O, Lagerung bei RT
RNA-Analyse	
20x MOPS Puffer	83,72 g MOPS, 8,2 g NaOAc, 3,4 g NaOH, 20 ml 0,5M EDTA
5x RNA-Probenpuffer	Spatelspitze Bromphenolblau, 720 µl 37 % Formaldehyd, 3,084 ml Formamid, 80 µl 500 mM EDTA pH 8,0, 4 ml 10x MOPS, 2 ml 100 % Glycerol, mit DEPC-Wasser auf 10 ml auffüllen
Lösung für 1,0-1,5% RNA-Agarose-Gel	1 - 1,5 g Agarose in 90 ml ddH ₂ O, 2,5 µl Ethidiumbromid, 6,5 ml 20x MOPS, 10,5 ml 37 % Formaldehyd
Immunoassay	
1x Enhancement-Arbeitslösung	1 % Enhancement Lösung I mit 10 % Enhancement-Lösung II in ddH ₂ O, Lagerung bei RT unter Lichtausschluss
10x Enhancement-Lösung II	68 mM KHP und 6 % Essigsäure in ddH ₂ O, Lagerung bei 4 °C
100x Enhancement-Lösung I	100 mM Thenoyltrifluoroacetone, 10 mM Tri-n-octylphosphinoxide, 2 % EtOH, 20 % Triton®X-100 in ddH ₂ O, Lagerung bei 4 °C
Beschichtungspuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O, pH 7,4, Lagerung bei RT
FPLC-Elutionspuffer IgG₁	0,1 M Zitronensäure, pH 5,0
FPLC-Elutionspuffer IgG_{2a}	0,1 M Zitronensäure, pH 4,5
FPLC-Elutionspuffer IgG_{2b}	0,1 M Zitronensäure, pH 3,0
FPLC-Ladepuffer IgG₁	3 M NaCl, 0,05 M Tris, 0,02 % NaN ₃ , pH 8,9
FPLC-Ladepuffer IgG_{2a/b}	PBS, pH 8,2

FPLC-Waschpuffer	entspricht FPLC-Elutionspuffer IgG _{2b}
Immunoassay-Puffer (LKC)	50 mM Trizma®base, 154 mM NaCl, 20 µM DTPA, 0,01 % Tween 40, 0,05 % NaN ₃ , 0,05 % bovines γ-Globulin, 0,5 % BSA in ddH ₂ O, steril filtriert (0,8 µm Zellulose-Filter), pH 7,7, Lagerung bei 4 °C
Neutralisierungs-Puffer	1 M Tris-HCl, pH 9,0
PBST	2x 5 g Tabletten in 1l ddH ₂ O lösen und 0,05 % Tween20

Tabelle 4 Benutzte Datenverwaltungssysteme

Datenbank	Internetadresse
BLAT Search	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
Electronic PCR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/epcr/
EST profile (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer
National Center for Biotechnology	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
NCBI Nucleotide	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide
Primer-BLAST NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu

Tabelle 5 Benutzte Software

Software	Firma bzw. Internetadresse
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems GmbH (München)
Analyst 1.5	AB SCIEX (Framingham, MA, USA)
Bio-Rad iCycler iQ 3.0	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
ChemDraw 13.0	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
EndNote	Thomson Reuters (New York, NY, USA)
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA)
Microsoft Office 2007	Microsoft Deutschland (Unterschleißheim)
MicroWin 2000	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Primer3 4.0	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
REST MCS	http://rest.gene-quantification.info

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 RNA-Isolierung mit Trizol

Das Standard-Protokoll des Herstellers für die Isolierung der RNA aus verschiedenen Zellkulturlinien wurde zu Gunsten größerer RNA-Ausbeute optimiert. Es wurden 0,5 ml Trizol / 9 cm² Wachstumsfläche bei RT zugegeben, die Zellen durch mehrmaliges auf und ab pipettieren lysiert und anschließend in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Als Zwischenschritt konnten die so gewonnenen Proben bei -20 °C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt aufgearbeitet werden. Das Reaktionsgefäß wurde dazu wieder aufgetaut und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde eine Keramikugel hinzugefügt und das Reaktionsgefäß für 5 min bei einer Geschwindigkeit von 15 / s im Tissue Lyser geschüttelt. Nach dem Zellaufschluss wurden 100 µl Chloroform zugegeben und für 15 sec bei gleicher Geschwindigkeit wie zuvor gemischt. Die Proben wurden für 2-3 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 10 min, 12.000 g, RT). Nach der Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase abgenommen und zu 0,5 ml eiskaltem Isopropanol gegeben um die RNA zu präzipitieren. Das Gemisch wurde gevortext, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 10 min, 12.000 g, 4 °C). Der entstandene wässrige Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet 2x mit je 1 ml 75 % Ethanol (angegesetzt mit DEPC-Wasser) durch Zentrifugation (4 °C) gewaschen. Zuletzt wurde versucht das Ethanol möglichst vollständig zu entfernen bzw. abdampfen zu lassen. Das RNA-Pellet wurde zum Ende in durchschnittlich 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen und die Probe bei -20 °C einmal eingefroren. Dieser Schritt stellt sicher, dass das gesamte RNA-Pellet in Lösung geht. Nach dem Auftauen der RNA auf Eis konnte die RNA-Konzentration und Reinheit mit dem Nanodrop bestimmt und mit DEPC-Wasser auf eine einheitliche Konzentration (500 ng / µl) gebracht werden. Stichprobenartig wurde die Reinheit der RNA-Proben ausserdem auf einem RNA-Gel getestet. Der Anteil der RNA, welcher für die cDNA-Synthese eingesetzt werden sollte, wurde anschließend mit DNase I verdaut um genomische DNA zu entfernen. Die dauerhafte Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

4.1.2 cDNA Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde für alle Proben die gleiche Menge RNA eingesetzt, mit randomisierten Primern versetzt und in dem anschließenden Reaktions- und Temperatur-Schema in cDNA umgeschrieben. Auf Eis wurde ein Mastermix für alle Proben angesetzt, der folgende Bestandteile je Probenansatz hatte:

11 µl DEPC-Wasser

4 µl 5x iScript select reaction-Mix

2 µl randomisierte Hexamere

1 µl Reverse Transkriptase

Zu jedem Mastermix (18 µl) wurden 2 µl der vorbereiteten RNA gegeben (500 ng/µl) oder in Abhängigkeit der RNA Konzentration der Anteil an DEPC-Wasser so verringert, dass 1 µg RNA für die reverse Transkription zur Verfügung stand. Das cDNA-Synthese Programm lief wie folgt:

5min bei 25 °C / 30 min bei 42 °C / 5 min bei 85 °C

Anschließend wurde 1 µl Rnase H zugegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Durch diesen Verdau sollte die als Template eingesetzte RNA abgebaut werden um interferierende Signale in der qPCR zu verhindern. Die cDNA wurde anschließend 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert bis zur weiteren Verwendung.

4.1.3 qPCR

Mit der qPCR kann man quantitativ DNA- und RNA-Mengen bestimmen, wobei für die Quantifizierung der in die ds DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green verwendet wurde. So bekommt man eine Aussage zur Genexpression in verschiedenen untersuchten Geweben bzw. den entsprechenden Zelllinien. Die unter 4.1.4 aufgelisteten Primer wurden für diese Versuche verwendet. Die Fluoreszenzzunahme je Zyklus korreliert mit der Anreicherung des jeweiligen PCR-Produkts sowie mit der Anzahl der Kopien, die am Beginn als cDNA vorlagen. Auf Eis wurde folgender Mastermix für die qPCR angesetzt:

12,5 µl SYBR-Green Mastermix

7,0 µl HPLC-Wasser

0,25 µl Primer 1 (100 nM)

0,25 µl Primer 2 (100 nM)

Jeweils 20 µl des Mastermixes wurden vorgelegt und 5 µl der verdünnten cDNA (< 250 ng, 12,5 ng standardmäßig und 25 ng für primäre murine Langerhanssche Inseln) zugegeben. Alle Proben auf einer 96 Well Platte wurden anschließend scharf abzentrifugiert und falls nötig bis zur Verwendung an diesem Tag bei 4 °C gelagert. Die Amplifikation und Messung wurde im Bio-Rad Laboratories iCycler mit folgendem Protokoll durchgeführt:

Initial: 15 min 95 °C und 2 min 95 °C

40 Zyklen: 30 sec 95 °C / 45 sec 62 °C (58 °C) / 30 sec 72 °C

Final: 3 min 72 °C.

Die Software des iCyclers ermittelt den Ct-Wert (cycle of threshold). Dieser wird in Bezug zu einem nicht regulierten housekeeping Gen (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), 18S, β-Actin) gesetzt. In Abhängigkeit von der Fragestellung erfolgte die Auswertung nach der $2^{-\Delta Ct}$ oder $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Bei der ersten Überprüfung der Primer wurde immer eine Schmelzkurve erstellt.

Zur Kontrolle der Primer wurde nach der qPCR immer ein Agarose-Gel angefertigt und die erwartete Primer-abhängige Fragmentgröße des Amplifikats nachgeprüft.

4.1.4 Primer

Tabelle 6 Zusammenfassung der untersuchten Gene und zugehörige Primerpaare in Zellkulturen und primären Zellen der Maus

Maus Gen	Sequenz	Amplikonlänge	Name
TH Transporter			
Slc16a10 fwd	GCCCCATCGTGAGTGTCTTC	182 bp	Mct10
Slc16a10 rev	GACCAGTGACGGCTGGTAGG		
Slc16a2 fwd	CCTCGCTATGGGCATGATCT	202 bp	Mct8
Slc16a2 rev	TGGTTGAAAGGCGAATGAGC		
Slc7a8 fwd	GCCACCCGGGTTCAAGATA	189 bp	Lat2
Slc7a8 rev	ATAGGCAAAGGAGCCCTGGA		
Slc7a5 fwd	GGCCATCATCATCTCCTTGC	197 bp	Lat1
Slc7a5 rev	ACCCATTGACAGAGCCGAAG		
unspezifische Transporter			
Slco1a1 fwd	GCAGCTGCTTAACGGACACA	196 bp	
Slco1a1 rev	TTGTCACACTCAGGGCCTTTC		
Slc10a1 fwd	CCTTGCGCCATAGGGATCTT	185 bp	Ntcp
Slc10a1 rev	GGCATCAGGGAGGAGGTAGC		
Slco6c1 fwd	CTGTTGCAGAGTGGGTGGTG	193 bp	
Slco6c1 rev	GAAAACCCTTCAAATGAGGTTGA		
Slco6b1 fwd	TGGGAGGTTTCATTGTTTCCA	219 bp	
Slco6b1 rev	TGGAACGGTCACAACCACAG		
Slco4c1 fwd	TGGCAAACTTCCCAGACTCA	186 bp	
Slco4c1 rev	AAAAATGTGGCAAATCCCGTA		
Slco4a1 fwd	TGACCACTGACAGCCCACTG	205 bp	
Slco4a1 rev	TTGCCAAAAGCTGGATTGCT		
Slco1c1 fwd	AGTGTGGCCGGACTGACTGT	186 bp	Oatp14
Slco1c1 rev	ACTCCGGCTGGAGGATTGAC		
Slco1b2 fwd	GCAAGGCACTAGGTGGAGTCA	201 bp	
Slco1b2 rev	CAATGCCCATGATGAAGCAA		
Slco1a5 fwd	CATCCTGACAAGTGTGCTCCAG	211 bp	

Slco1a5 rev	TGCCATGTATGCAGCCTTCTT		
Slco1a4 fwd	GGATTCTGGCTATCCCTGACTG	187 bp	
Slco1a4 rev	CTGGGTCCCATGTGTTCGTT		
Deiodase			
Dio1 fwd	CACAGCCGATTCCTCATCA	184 bp	Dio1
Dio1 rev	GCTGCTCTGGTTCTGCATTG		
Dio2 fwd	CTCCAACTGCCTCTTCCTGG	211 bp	Dio2
Dio2 rev	GACGTGCACCACACTGGAAT		
Dio3 fwd	CTACATCGAGGAAGCCCACC	203 bp	Dio3
Dio3 rev	TGACGTAGAGGCGCTCAAAA		
Referenzgene			
hprt fwd	GGCCAGACTTTGTTGGATTTG	144 bp	HPRT
hprt rev	TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT		
potenzielle 3-T₁AM Transporter			
Slco3a1 fwd	TCTTCTCGTCCCTCCTGATG	224 bp	Slco3a1
Slco3a1 rev	CACAGGGTTTGAGAGCAGGT		
Slc7a1 fwd	CTGGAGTGCGACTTTTGACG	179 bp	Slc7a1
Slc7a1 rev	TGTTGACCATGGCTGACTCC		
Slc31a1 fwd	TTGTTTTCCGGTTTGGAATCA	178 bp	Slc31a1
Slc31a1 rev	GGATGGTTCCATTGGTCCT		
MAO			
MaoA fwd	GGGGCTGCTACACAGCCTAC	243	MaoA
MaoA rev	CAAGAGCTGGAACATCCTTGG		
MaoB fwd	ATTGCCACGCTCTTTGTGAA	237	MaoB
MaoB rev	CCCTGTCTGGTCAATGTGGA		

Tabelle 7 Zusammenfassung der untersuchten Gene und zugehörige Primerpaare in humanen Zellkulturen

Human Gen	Sequenz	Amplikonlänge	Name
TH Transporter			
SLC10A1 fwd	CAATGTGGGGAAGAGCATCA	199 bp	NTCP
SLC10A1 rev	AAAGGCCACATTGAGGATGG		
SLC16A10 fwd	TTTGTTGGGCTCATGTCCAG	203 bp	MCT10
SLC16A10 rev	AGCAAAGGCAGCAGGATTGT		
SLC16A2 fwd	TGCTTTCATTGGCCTCCATA	174 bp	MCT8
SLC16A2 rev	CCAGCAGACACCACACCATT		
SLC7A8 fwd	GTCATCGCCCTCACCTTCTC	202 bp	LAT2
SLC7A8 rev	TGATGATAATCAGGGCCAAGG		
SLC7A5 fwd	CGTGAAGTCTACAGCGTGA	167 bp	LAT1
SLC7A5 rev	CATCCAGTTTGGTGCCTTCA		
SLCO4C1 fwd	TTCTGTGCCCACACACAAGTC	158 bp	
SLCO4C1 rev	GCGGATCATCCTCAGTGACA		
SLCO4A1 fwd	CCGTTCCCATCCTTGTTAC	166 bp	
SLCO4A1 rev	AGCAGGAGCCAGATGGAGAG		
SLCO1C1 fwd	TCTCTGTTCGGCATGGTGAC	175 bp	OATP14
SLCO1C1 rev	TTGCAGCTCCACACACACTG		
Referenzgen			
ACTB fwd	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	184 bp	β -Actin
ACTB rev	AGCACTGTGTTGGCGTACAG		

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Bradford-Prinzip

Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Komplexbildung von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie-Blau G250. Daraus resultiert eine Absorptionsmaximums-Verschiebung des Farbstoffes von 470 zu 595 nm, die im Photometer bestimmt werden kann. Die Absorption bei 595 nm ist proportional zur eingesetzten Menge Protein in der zu vermessenden Lösung. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration geschieht über eine IgG-Standardreihe (Bio-Rad Laboratories, München).

4.2.2 Bradford-Durchführung

Ausgangsmaterial waren Zelllinien, die in 200 µl oder 100 µl Homogenisationspuffer je 9 cm² oder 3,6 cm² Wachstumsfläche aufgenommen wurden. Die Proteinbestimmung wurde im 96 Well Format in Dreifachbestimmung je Probe durchgeführt. Je Probe wurden 5 µl im Well vorgelegt und ad 200 µl mit H₂O aufgefüllt. Anschließend wurden je Well 50 µl Bradford Reagenz mit einer Multipette zugegeben so dass eine 1:5 Verdünnung des Substrats wie im Manual beschrieben resultiert. Die Platte wurde abgeklebt und 10 min bei RT unter Schütteln (750 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt und die Proteinkonzentration anhand der mitgeführten Standardreihe über lineare Regression bestimmt. Die Standardreihe wurde wie folgt angesetzt, wobei die Stockkonzentration des BSA zwischen 1,34 und 1,42 µg/µl variieren konnte (Bradford-Standard, Bio-Rad Laboratories, München):

Tabelle 8 Standard-Reihe zur Bestimmung der zellulären Protein-Konzentration

BSA Standard [1,34 µg/µl]	Volumen Standard	dH ₂ O ad 200 µl
µg/µl	µl	µl
0	0	200
1,34	1	199
2,68	2	198
6,70	5	195
13,40	10	190
20,10	15	185
26,80	20	180

4.3 Zellkultur

4.3.1 Murine pankreatische MIN6-Zelllinie

Die vorhandenen Cryo-Stocks waren mykoplasmenfrei und in Passage 14 konserviert. Alle Experimente wurden mit MIN6 Zellen durchgeführt, die nicht älter als Passage 25 waren.

Die Zelllinie MIN6 wurde in DMEM (Biochrom, 4,5 g/l Glukose, stabiles L-Glutamin, 10 % FBS, Mercaptoethanol) kultiviert (124). 24 h vor jedem Versuch wurde das Kulturmedium durch Fastenmedium (DMEM Biochrom, 1,0 g/l Glukose, stabiles L-Glutamin, 0 % FBS, Mercaptoethanol) ersetzt. Vor jedem Experiment wurden die Zellen für drei definierte Passagen mit 100 nM Natriumselenit kultiviert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 - 1:5 alle vier bis sechs Tage vereinzelt. Die Zelldichte erreichte in Dauerkultur maximal 70 - 80 %.

4.3.2 Humane hepatozelluläre HepG2-Zelllinie

Verwendete Cryostocks waren mykoplasmenfrei. Für die Versuche wurden die Zellen in den Passagen 18-28 verwendet. Die Zelllinie HepG2 wurde in DMEM (Biochrom, 4,6 g/l Glukose, stabiles L-Glutamin, 1 % NEAA, 10 % FBS) kultiviert. Vor jedem Versuch wurden die Zellen auf ein Fastenmedium für 24 h gesetzt, was dem FBS-freiem Kulturmedium entspricht. Vor jedem Experiment wurden die Zellen für drei definierte Passagen mit 100 nM Natriumselenit kultiviert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:5 alle drei bis vier Tage vereinzelt. Die Zelldichte erreichte in Dauerkultur maximal 70 – 80 %.

4.4 Zytotoxizitäts-/Zellviabilitäts-Assays

4.4.1 MTT Assay – NADPH-abhängiger Zelltoxizitäts-Assay

4.4.1 a) Prinzip des Assays

Zellen werden im MTT-Assay auf ihre Lebensfähigkeit nach Applikation einer potenziell zytotoxischen Substanz getestet. Das schwach gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) wird in den lebenden Zellen zu dem wasserunlöslichen dunkelblauen Formazan reduziert. Das Detergenz SDS lysiert die Zellen und setzt das Formazan frei, welches photometrisch bei 595 nm gemessen werden kann. An dem Umsatz sind überwiegend NADH und NADPH abhängige enzymatische Reaktionen beteiligt, womit der Farbstoffumsatz zum Großteil ein Indikator für zelluläre Glykolyse ist. Die partielle Reduktion des MTTs durch die Mitochondrien (Succinat-Dehydrogenase) als Indikator der Zellatmung spielt eine untergeordnete Rolle (125-127).

4.4.1 b) Durchführung

MIN6 Zellen wurden in einer Dichte von 20.000 Zellen / 200 µl in einer 96 Well Platte ausgesät. An Tag 3 wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und KRBH mit unterschiedlichen Konzentrationen 3-T₁AM und TA₁ bzw. der korrespondierenden DMSO-Kontrolle zugegeben. Nach 2 h Exposition wurden 10 Vol % MTT (1 mg / ml) zugefügt, auf dem Plattenschüttler gemischt und für weitere 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Substanz- und MTT Exposition wurde durch Absaugen des Mediums gestoppt. Je Well wurden 100 µl Lysis-Puffer zugegeben. Die Zellen wurden nach 5 min Inkubation bei RT anschließend für 5 min durch Schütteln lysiert. Die photometrische Messung wurde bei 595 nm durchgeführt. Der Mittelwert der OD₅₉₅ der mit DMSO-Lösungsmittel behandelten Zellen wurde repräsentativ auf 100 % gesetzt (128). Die 3-T₁AM und TA₁ behandelten Zellen wurden ins prozentuale Verhältnis zur Kontrolle gesetzt. Substanzinkubationen wurden mit sechs Wells pro Gruppe durchgeführt.

4.4.2 ATP-Zellviabilitätsassay

4.4.2 a) Prinzip des Assays

Der CellTiter-Glo Lumineszenz Zellviabilitäts-Assay bietet die Möglichkeit lebende Zellen aufgrund ihres intrazellulären ATP-Gehaltes, der ein Parameter für die metabolische Aktivität der Zellen ist, zu charakterisieren.

4.4.2 b) Durchführung

MIN6 Zellen wurden für die Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts in einer Dichte von 10.000 Zellen / 100 µl / Well in Zellkulturmedium in einer 96 Well Platte ausgesetzt. An Tag 3 wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und jenes durch KRBH mit unterschiedlichen 3-T₁AM- und TA₁-Konzentrationen bzw. der korrespondierenden DMSO-Kontrolle ersetzt. Nach 2 h Exposition wurde dem Expositionsmedium eine volumenäquivalente Menge CellTiter Glo Substrat zugesetzt und zwei Minuten geschüttelt um die Zellen zu lysieren. Für die Stabilisierung des Lumineszenzsignals wurde die Platte anschließend bei Raumtemperatur 10 min belassen. Anschließend wurde die Lumineszenz im Luminometer bestimmt.

4.5 Zelluläre Aufnahme / Zelloberflächenbindung von 3-T₁AM

MIN6 Zellen wurden für die Analyse der 3-T₁AM Aufnahme in einer Dichte von 300.000 Zellen / 2 ml / 9 cm² ausgesät. Das Kulturmedium wurde an Tag 5 für 24 h durch Fastenmedium ersetzt. Das Medium wurde am Versuchstag durch KRBH mit 200 µM Iproniazid als Mao-Inhibitor oder einer dementsprechenden DMSO-Kontrolle ersetzt. Die Zellen wurden in dem Medium für 20 min vorinkubiert, so dass die maximale Mao-Inhibition erreicht wurde. Anschließend wurde das Medium

des Vorinkubationsschritts entfernt und durch 0,5 ml KRBH mit 100 nM 3-T₁AM bzw. der korrespondierenden DMSO-Konzentration als Kontrolle ersetzt. Die 3-T₁AM Inkubation wurde bei 37 °C für 0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30 min durchgeführt. Am Ende der Inkubation wurden die Platten geschüttelt um eine Gleichverteilung des Mediums herzustellen. 200 µl wurden für eine spätere LC-MS/MS-basierte Bestimmung von 3-T₁AM und seinen Metaboliten im Überstand abgenommen, abzentrifugiert (500 rpm, 10 min, 4 °C) und eingefroren. Die Substanzaufnahme der Zellen wurde durch Entfernen des restlichen Mediums und einen anschließenden Waschschrift mit eiskaltem KRBH gestoppt. Die Zellkulturplatten mit den Zellen wurden ohne Medium auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert bis zur weiteren Verwendung.

4.6 Extraktion der MIN6-Zellen für die LC-MS/MS Analyse

Für die Analyse der Zelllysate und Zellkulturüberstände wurden unterschiedliche Extraktionsmethoden, LC-MS/MS Anlagen und Messmethoden verwendet. Während der Promotionszeit wurde im Institut durch Drittmiteleinwerbung eine sensitive LC-MS/MS Anlage beschafft und Extraktions- sowie Messmethoden weiter entwickelt. Zugang zu der ersten LC-MS/MS Anlage war für vergleichende Messungen in Zelllysate und Kulturüberstand nicht mehr möglich.

Die Zellkulturplatten wurden auf Eis angetaut. Pro Well wurden 200 µl Homogenisationspuffer zugegeben, die MIN6-Zellen in dem Puffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden danach auf Eis sonifiziert und nach dem folgenden Protokoll extrahiert (98). 10 Vol % wurde separiert für die Normalisierung der LC-MS/MS Daten mittels Proteinbestimmung verwendet. 10 Vol % 100 % Essigsäure wurde zu den sonifizierten Proben zugegeben um diese für die folgende Extraktion anzusäuern. Zu jeder Probe wurde 1 µl des Internen Standards (10 µM ²H₄-3-T₁AM) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde ein dreifaches Volumen Aceton zu den Proben gegeben und für eine Minute gevortext. Die Proteinfällung wurde über Nacht bei -20 °C durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurden die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 20.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch die Zugabe von 1 µl 30 %ige Schwefelsäure erneut angesäuert. Es folgte eine zweifache Cyclohexan-Extraktion. Dazu wurde zuerst eine volumenäquivalente Menge Cyclohexan zugegeben, 1 min gevortext und anschließend 2 min bei 2.000 g und 4 °C bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der komplette Schritt noch einmal wiederholt. Die übrige Lösung wurde erneut mit 5 µl Schwefelsäure angesäuert, gefolgt von einer dreifachen Ethylacetat-Extraktion. 1 ml Ethylacetat wurde zugegeben, 5 min gevortext und anschließend zur Phasentrennung 2 min bei 2.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend in einem Lösungsmittelkonzentrator unter Vakuum eingeeengt (45 °C). Alle Schritte der Ethylacetat-Extraktion wurden zwei weitere Male

durchgeführt. Die Proben wurden im Vakuum-Konzentrator bis zur Trockenheit eingengt und anschließend in 50 µl ddH₂O : Methanol : Essigsäure (90 : 10 : 1) aufgenommen. Alle Proben wurden für 1 min gevortext, scharf abzentrifugiert und bei -20 °C bis zur Messung in der LC-MS/MS gelagert.

4.7 Extraktion der MIN6-Zellkulturüberstände für die LC-MS/MS Analyse

Die Zellkulturüberstände wurden aufgetaut, gevortext, erneut bei 500 g für 10 min und 4 °C abzentrifugiert um eventuell enthaltene Zellrückstände zu entfernen. Von den 200 µl Aliquots wurden 180 µl Zellkulturüberstand, entsprechend dem Volumen des Zellhomogenats, in die Extraktion eingesetzt. Je Probe wurde ein 6x Mix Interner Standards (je 1 µl einer 10 µM Lösung) zugesetzt (jeweils 10 pmol von ¹³C₆-T₃, ¹³C₆-T₄, ¹³C₆-rT₃, ¹⁵N-3,5-T₂, ¹³C₆-3,3'-T₂, ²H₄-3-T₁AM gelöst in DMSO) und für 15 Sekunden durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Kulturüberstände wurden danach angesäuert mit 5 µl 30 % HCl. Es wurde 1 ml 70 / 30 % (v/v) tert-Butylmethylether (TBME, CHROMASOLV® Plus degree) / Isopropanol zugegeben, 5 min gevortext und anschließend für 2 min bei 2000 g und 4 °C bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Konzentrator eingengt. Der gesamte Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, der zweite Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt und bis zur Trockenheit eingengt. Die extrahierten Pellets wurde in 100 µl ddH₂O : Methanol : Essigsäure (90 : 10 : 1) aufgenommen, 1 min gevortext und bei -20 °C bis zur Analyse in der LC-MS/MS gelagert. Für die Analyse im getrennten Positiv- und Negativ-Modus der LC-MS/MS wurden jeweils 40 µl injiziert.

4.8 LC-MS/MS Parameter

4.8.1 AbSciex 4000 - Analyse Zellkultur-Zelllysate

Die LC-MS/MS Analyse von TH und deren Metabolite in Lysaten aus Zellkulturexperimenten wurden mit einem Shimadzu Ultrafast Flüssigkeitschromatographie (UFLC) System durchgeführt. Dieses besteht aus einer Kontrolleinheit, zwei Pumpen mit Entgasereinheit (Shimadzu Scientific Instruments, Schweiz, Columbia, MD, USA) sowie einem Autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz). Die UFLC ist gekoppelt an einen QTRAP®4000 Triple-Quadrupole Tandem Massenspektrometer (AB Sciex, Darmstadt, Berlin), ausgestattet mit einem TurbolonSpray-Interface (Arbeitsparameter siehe Tabelle 9). Der Säulenofen wurde bei 40 °C und der Autosampler bei 10 °C betrieben. TH und TAM wurden sowohl im Positiv- als auch Negativ-Modus (ESI) analysiert, wohingegen Thyroessigsäuren ausschliesslich im Negativ-Modus detektiert werden konnten (siehe Tabelle 10). Die Analyse wurde im „selected reaction monitoring“ (SRM) Modus durchgeführt.

Tabelle 9 Arbeitsparameter des Massenspektrometers zur Erfassung der Massenspektren von Mutter- und Tochterionen

Parameter	Einheit
TurbolonSpray Spannung (IS)	5500 V
Stickstoff / Curtain Gas (CUR)	30 psi
Kollisionsgas (CAD)	5 psi
Verneblungsgas (Gas1)	60 psi
Heizgas (Gas2)	50 psi
Anfangspotenzial (EP)	10 V
Temperatur der Ionenquelle	400 °C
dwell Zeit	50 ms

Tabelle 10 Substanz-abhängige LC-MS/MS Parameter AbSciex 4000

Substanz	(m/z)a Q1	(m/z) Q3	DP	CE	CXP
Positiv ESI Modus					
3-T ₁ AM	356,0	339,0	91,0	19,0	10,0
		212,1	91,0	27,0	14,0
T ₀ AM	230,1	213,1	76,0	19,0	14,0
		109,1	76,0	35,0	18,0
² H ₄ -3-T ₁ AM	360,0	343,1	86,0	21,0	10,0
		216,1	86,0	29,0	34,0
Negativ ESI Modus					
3-T ₁ AM	353,7	126,9	-80,0	-26,0	-7,0
T ₀ AM	227,9	107,9	-90,0	-30,0	-5,0
TA ₁	368,9	126,7	-40,0	-14,0	-21,0
TA ₀	242,8	126,7	-50,0	-22,0	-13,0
² H ₄ -3-T ₁ AM	357,9	126,9	-90,0	-26,0	-7,0

Legende: (m/z): Massen-Ladungs-Verhältnis; Q1: Ausgangsionen im ersten Quadrupole; Q3: am besten ausgeprägtes Produkt-Ion im dritten Quadrupole; DP = declustering Potenzial (V); EP = Eingangspotenzial Kollisionszelle; CE = Kollisionsenergie (V); CXP = Ausgangspotenzial Kollisionszelle (V).

Für die chromatographische Trennung wurde eine Synergi Polar-RP 80-Å Säule (150 x 2 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) mit einer Flussrate von 300 µl / min verwendet. Die verwendete wässrige mobile Phase bestand aus 0.6 % Essigsäure in 5 % Acetonitril. Die organische mobile Phase enthielt 0.6 % Essigsäure in 95 % Acetonitril. Der HPLC-Gradient startete bei 100 % wässrige mobile Phase für 2 min, sinkt in den nächsten 10 min auf 60 % ab, sinkt weiter auf

5 % in den folgenden 3 min und wird in der Folgeminute sofort wieder auf 100 % angehoben und endet nach insgesamt 20 min. Der Gradient der organischen mobilen Phase läuft entgegengesetzt. Alle verwendeten Analyten und isotopenmarkierten Standard-Substanzen wurden in DMSO gelöst und in 1 % Essigsäure in H₂O / Acetonitril (50 : 50 (v / v)) zu 10 µM Arbeitslösungen verdünnt. Die Datenanalyse wurde mit der Analyst Software Version 1.5 durchgeführt.

4.8.2 AbSciex 6500 – Analyse Zellkulturüberstände

Für den Nachweis von T₁AM, TA₁ und den Internen Standards im Zellkulturüberstand wurde ein 1260 Quadruplex HPLC System (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn) gekoppelt an ein Massenspektrometer QTrap 6500 (AB SCIEX Deutschland GmbH, Darmstadt) inklusive Turbo Spray IonDrive genutzt. Die Anlage wurde mit einer HSS 2,5 µm 3,0 x 100 mm Säule (Waters, Milford, MA, USA) bei 40 °C verwendet (HPLC-Gradient siehe Tabelle 11) und komplettiert mit einem PAL HTC-xt Autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz).

Tabelle 11 HPLC-Gradient zur chromatographischen Trennung von TH, TAM und TA

Gradient		
[min]	% Eluent A ddH ₂ O	% Eluent B Methanol
0	55	45
0,50	55	45
1,00	40	60
3,50	33	67
4,50	33	67
5,25	2	98
6,50	2	98
7,00	55	45
8,00	55	45

Als Waschlösung 1 wurde 25 / 25 / 25 / 25 ddH₂O / Acetonitril / Isopropanol / Methanol (v / v / v / v) verwendet. Die Waschlösung 2 war 50 / 50 aus ddH₂O und Methanol (v / v) zusammengesetzt. Jeweils 40 µl Probenvolumen wurden bei einer Flussrate von 0,9 ml / min injiziert. Die HPLC-Laufmittel bestanden aus 0,1 % (v / v) Methansäure in ddH₂O (Eluent A) und 0,1 % (v / v) Methansäure in Methanol (Eluent B). Die komplette Analysezeit ist 8 min. Der Lösungsmittelgradient pro Lauf ist in der nachfolgenden Tabelle 12 beschrieben.

Tabelle 12 Arbeitsparameter des Massenspektrometers zur Erfassung der Massenspektren von Mutter- und Tochterionen

Parameter	Einheit (+ESI)	Einheit (-ESI)
TurbolonSpray Spannung (IS)	4500 V	- 4500 V
Stickstoff / Curtain Gas (CUR)	45 psi	45 psi
Ionenspray Gas 1	55 psi	80 psi
Ionenspray Gas 2	70 psi	55 psi
Temperatur der Ionenquelle	600 °C	450 °C
dwell Zeit	10 ms	35 ms

Das Massenspektrometer wurde im Elektronenspray Positiv-Ionisierungsmodus oder im negativen massearmen Ionisierungsmodus betrieben (siehe Tabelle 13). Systemkontrolle und Datenerhebung wurden mit Analyst 1.6.2 durchgeführt. Für die Datenverarbeitung wurde das Software Programm Multiquant 2.1.1 verwendet. Als Vernebelungs- und Kollisionsgas wurde Stickstoff verwendet. Die Probenanalyse wurde im Multi-Reaktions-Monitoring Modus (MRM) durchgeführt.

Tabelle 13 Substanz-abhängige LC-MS/MS Parameter AbSciex 6500

Substanz	(m/z)a Q1	(m/z) Q3	DP	EP	CE	CXP
Positiv ESI Modus						
3-T₁AM	355,8	338,9	91	10	15	10
	355,8	212,1	91	10	25	10
T₀AM	230,0	213	11	10	15	12
	230,0	108,8	11	10	31	12
3-TA₁	399,9	353,9	96	10	23	14
T₀	274,0	215,1	51	10	25	6
	274,0	118,1	51	10	57	8
²H₄-3-T₁AM	359,9	342,8	81	10	17	12
	359,9	216,1	81	10	27	10
Negativ ESI Modus						
3-TA₁	368,8	324,7	-60	-10	-5	-10
	368,8	126,8	-60	-10	-40	-6
²H₄-3-T₁AM	358,1	126,7	-125	-10	-24	-21
	358,1	199,2	-125	-10	-34	-1

Legende: (m/z): Massen-Ladungs-Verhältnis; Q1: Ausgangsionen im ersten Quadrupole; Q3: am besten ausgeprägtes Produkt-Ion im dritten Quadrupole; DP = declustering Potenzial (V); EP = Eingangspotenzial Kollisionszelle; CE = Kollisionsenergie (V); CXP = Ausgangspotenzial Kollisionszelle (V).

4.9 Glukose-stimulierte Insulin-Sekretion (GSIS)

MIN6 Zellen wurden für GSIS-Versuche in einer Dichte von 200.000 Zellen / ml / Well in 12 Well Platten ausgesetzt. Die Zellen wurden für 55 h im Inkubator belassen. Anschließend wurde das Kulturmedium durch das Fastenmedium für 24 h ersetzt. Am Beginn der GSIS-Versuche am darauf folgenden Tag wurden alle Wells zuerst mit KRBH gewaschen und anschließend in KRBH mit 0.1 mM Glukose, sowie 200 μ M Iproniazid bzw. der entsprechenden DMSO-Konzentration für 2 h vorinkubiert. Iproniazid wurde anschließend entfernt und durch KRBH mit 10, 100 nM 3-T₁AM, DMSO Negativ-Kontrolle oder 30 mM KCl als Positiv-Kontrolle ersetzt. Die Substanzexposition wurde für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ und 2,8 mM Glukose durchgeführt. GSIS wurde durch Schütteln der Platten und Entfernen des Überstandes gestoppt. Die Platten mit den Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bei -80 °C bis zur Proteinbestimmung gelagert. Die Zellkulturüberstände wurden bei RT und 2.000 g, 5 min lang abzentrifugiert um Zellreste im Medium zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen, in zwei getrennte Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -80 °C bis zur Insulin-Bestimmung gelagert. Die Insulin Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde für die Messung 1:10 im Kalibrator des ELISAs verdünnt.

4.10 Analyse Substrat-spezifischer Energieumsatz mit Seahorse XF

Bioanalyser

4.10.1 Prinzip der Messung

Zellulärer Energiestoffwechsel ist der Prozess der Aufnahme von Substraten (Sauerstoff, Glukose, Fettsäuren und Glutamin) und die enzymatische Umsetzung dieser in Energieäquivalente. Dies geschieht durch eine ganze Abfolge von enzymatischen Oxidations- und Reduktionsreaktionen. Der Abbau der Substrate resultiert in der Anreicherung von ATP als Hauptprodukt, sowie Wärmeenergie und chemischen Nebenprodukten (Laktat, CO₂). Die Sauerstoffaufnahme sowie die zelluläre Abgabe von Nebenprodukten kann mit dem Seahorse Bioanalyser nicht-invasiv, in Echtzeit und indirekt im Zellkulturüberstand des untersuchten Zellsystems gemessen werden. Dazu wird zum Einen die Rate des Sauerstoffverbrauchs durch die Zellen (Oxygen Consumption Rate, OCR) als Indikator der mitochondrialen Atmung erfasst. Zum Anderen können Zellen ATP durch nicht mitochondriale Substratverstoffwechslung (z.B. Glykolyse, Umsatz von Glukose zu Laktat) generieren, was unabhängig von der Sauerstoffaufnahme geschieht. Dies kann durch die Anreicherung und damit Ansäuerung des Mediums mit H⁺ und CO₂ über die Zeit im Medium erfasst werden (Extracellular Acidification Rate, ECAR).

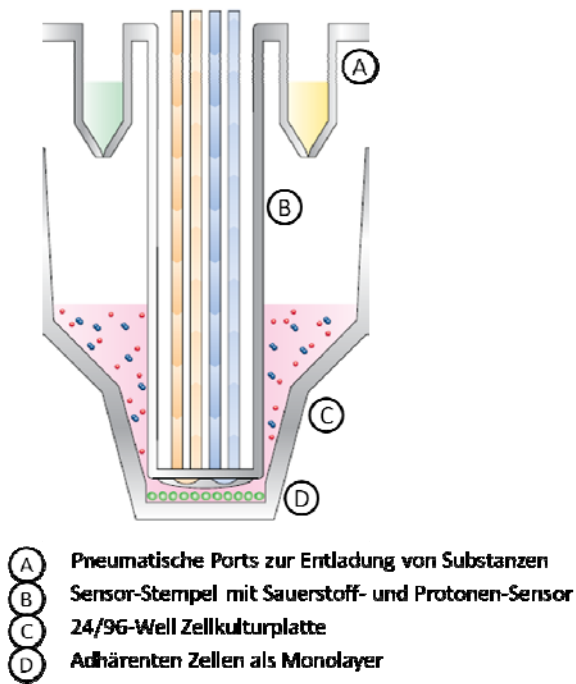


Abb. 11 Schematische Darstellung

Seahorse Bioanalyzer-Zellkulturwells (C) während der Messung im Bioanalyzer Der Sensorstempel (B) isoliert eine minimale Mediummenge über den adhärenenten Zellen (D) und detektiert darin die O_2 und H^+ Veränderungen über die Zeit. Abbildung modifiziert von www.seahorse-bio.com.

4.10.1 a) Mitochondriale Atmung

Um Aussagen zu verschiedenen Funktionen der mitochondrialen Atmung zu erhalten werden nach Messung der basalen Atmung sukzessiv Inhibitoren für verschiedene mitochondriale Komplexe bzw. ein Entkoppler zugegeben. In Abhängigkeit der Fragestellung werden die Zielzellen bis zu 24 h, eine Stunde als Präinkubation vor der Messung oder akut (Zugabe über Port) mit TH behandelt. Als Erstes wird Oligomycin zugegeben was die ATP-Synthese inhibiert. Dies wird durch Blockierung des Protonen-Kanals der F_0 -Untereinheit der ATP-Synthase (Komplex V) erreicht. So kann zwischen dem Sauerstoff-Verbrauch durch ATP-Synthese und dem Sauerstoff-Verbrauch zur Überwindung des natürlichen Protonen-Lecks der inneren mitochondrialen Membran unterschieden werden.

Als Nächstes wird FCCP (Carbonyl-Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon) oder DNP (2,4-Dinitrophenol), beides Ionophore, die als mobile Elektronentransporter fungieren, zugegeben. FCCP und DNP sind Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, da sie die ATP-Synthese unterbrechen indem sie Wasserstoffionen über die innere Mitochondrienmembran transportieren, die damit nicht mehr aus der Matrix über den Protonen-Kanal der ATP-Synthase (Komplex V) in den Zwischenraum gelangen können. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt zu einem rapiden Sauerstoff- und Energie-Konsum ohne dass daraus ATP entsteht. OCR steigt damit massiv an (Sauerstoffaufnahme). Ebenso steigt ECAR massiv an, da die Zellen die fehlende ATP-Produktion durch Steigerung der Glykolyse ausgleichen. Die Zugabe von FCCP / DNP wird dazu

genutzt die Reservekapazität der Atmung zu bestimmen. Sie wird definiert durch den maximalen Anstieg nach Entkoppler-Zugabe (Maximale Atmung), vermindert um die basale Atmung der Zellen. Diese Funktion ist ein Indikator für Zellvitalität unter Gabe eines physiologischen oder pathophysiologischen Stimulus. Selbst unter erhöhtem Stress sollten die Zellen in der Lage sein auf erhöhte Energiebedürfnisse zu reagieren.

Zuletzt werden die Inhibitoren Rotenon (Komplex I) und Antimycin (Komplex III) kombiniert zugegeben. Rotenon verhindert den Umsatz der Potentialenergie die in NADH gebunden ist zu nutzbarer Energie in Form von ATP. Dies geschieht durch die Unterbindung des Elektronenübergangs vom Complex I zum Coenzym Q. Antimycin bindet an die Cytochrom C Reduktase und inhibiert dadurch die Oxidation des Ubiquinol in der Elektronentransportkette der oxidativen Phosphorylierung, was die Aufrechterhaltung des Protonengradienten über die innere Membran unterbindet. Unter Wirkung dieser beiden Inhibitoren wird die mitochondriale Atmung komplett unterbunden, so dass diese von der nicht-mitochondrialen Atmung abgegrenzt werden kann. Eine geringere Sauerstoffaufnahme (OCR) geht mit einer Steigerung von ECAR einher, da jede Zelle bestrebt ist den intrazellulären Energiehaushalt durch Glykolyse aufrecht zu erhalten.

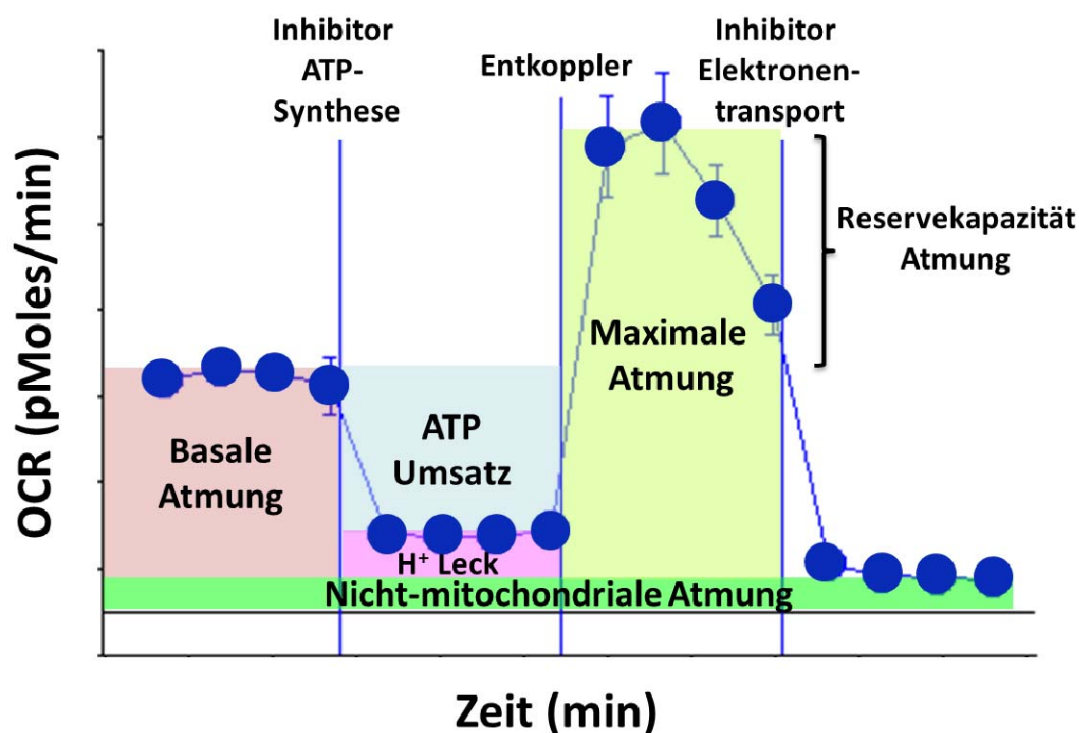


Abb. 12 Schematische Übersicht

Messschritte zur Charakterisierung der mitochondrialen Atmung. Nacheinander werden ATP-Synthase Inhibitor (Oligomycin), Entkoppler (FCCP, DNP) und Elektronentransport-Inhibitor (Rotenon und Antimycin) zugegeben, wodurch zusätzlich zur basalen Atmung der ATP-Umsatz sowie die maximale Atmung/Reservekapazität als Funktionen der mitochondrialen Verstoffwechselung berechnet werden können. Abbildung modifiziert von www.seahorse-bio.com.

Tabelle 14 Beschreibung und Berechnung der mitochondrialen Funktionen

Funktion	Beschreibung / Berechnung
Reservekapazität Atmung	= Entkoppler / Basale Atmung
ATP-Umsatz	= 1 – (Inhibitor ATP-Synthese / Basale Atmung)
Basale Atmung	letzter Messpunkt vor der ersten Injektion
Maximale Atmung	höchster Messpunkt nach Entkoppler-Zugabe
Nicht-Mitochondriale Atmung	verbleibende Atmung nach Inhibition Elektronentransport

Für die Berechnung der Reservekapazität und des ATP-Umsatzes wird von den individuellen Funktionen der Substanzzugabe die nicht-mitochondriale Atmung subtrahiert.

4.10.1 b) Glykolyse / Substratverstoffwechslung

Die Glykolyse ist neben der oxidativen Phosphorylierung der zweite Hauptweg der Energieproduktion in der Zelle. Ein Großteil der Zellen besitzt die Fähigkeit zwischen den beiden Möglichkeiten zur Energiegewinnung variabel zu wechseln. So können sie ihren Metabolismus den Veränderungen ihrer Umgebung anpassen und die Überlebenschancen steigern. Die bereitgestellte Glukose wird zu Pyruvat umgesetzt, welche dann im Zytosol zu Laktat oder von den Mitochondrien zu CO₂ und H₂O umgesetzt wird. Der zytoplasmatische Umsatz von Glukose in der Glykolyse produziert Protonen, die ins extrazelluläre Medium abgegeben werden. Die Ansäuerung des extrazellulären Mediums wird zeitlich aufgelöst durch einen pH-Sensor erfasst und durch den XF Analyzer als ECAR-Wert ausgegeben.

Zu Beginn der Glykolyse-Messung wird ECAR ohne Glukose vermessen um die nicht-glykolytische Ansäuerung im Medium zu bestimmen. Unter dieser Funktion wird die CO₂-Produktionen aus dem Trikarbonsäure-Zyklus (TCA) oder anderen biochemischen Wegen zusammen gefasst. Als erste Injektion wird eine sättigende Glukose-Konzentration (10 mM) zugegeben. Die Glukose wird von den Zellen aufgenommen und zur ATP-Produktion unter Abgabe von Protonen verstoffwechselt. Im Medium ist unter diesen Bedingungen ein Anstieg von ECAR messbar. Diese Glukose-stimulierte Antwort wird als basale Glykolyserate bezeichnet. Wird die oxidative Phosphorylierung durch die Zugabe des ATP-Synthase Inhibitors Oligomycin unterbunden, so steht Glukose als Substrat der Glykolyse vollständig zur Verfügung. Die Glykolyse-Rate steigt unter diesen Bedingungen an, da die Zelle versucht den Energiehaushalt unabhängig von den Mitochondrien aufrecht zu erhalten und weiter ATP zu generieren. Diese Funktion wird als maximale Kapazität der Glykolyse bezeichnet. Vermindert man diese Funktion um die Glukose-stimulierte Glykolyse-Rate so kann man abschätzen was die Reservekapazität des untersuchten Zellsystems ist. Zuletzt wird ein Glukose-Analogen 2-DG (2-Deoxyglukose) injiziert. Diese bindet und blockiert die Hexokinase als erstes Enzym der

Glykolyse, womit kein Glukose-Abbau mehr möglich ist. Der daraus resultierende Abfall von ECAR beweist, dass der vorherige ECAR-Anstieg glykolyse-spezifisch ist.

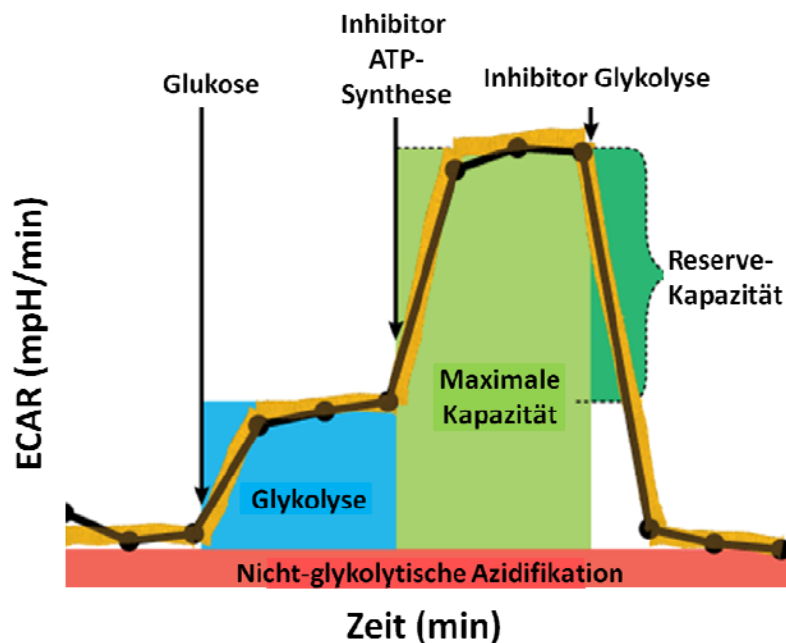


Abb. 13 Schematische Übersicht

Messschritte zur Charakterisierung der glykolytischen Aktivität. Sukzessive Zugabe von Substrat (10 mM Glukose), ATP-Synthase Inhibitor (Oligomycin) und Glykolyse-Inhibitor (2-Deoxyglukose) erlaubt es zusätzlich zur Glukose-stimulierten Glykolyse auch die Maximale und Reserve-Kapazität zu bestimmen. Abbildung modifiziert von www.seahorse-bio.com.

4.11 Immunoassay 3,5-T₂

4.11.1 Spezielle Reagenzien und Apparaturen

Die verwendete Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie- (FPLC) Apparatur wurde von der Firma GE Healthcare (Freiburg) gekauft. Fetales Kälberserum (FCS), DMEM Medium, Pferde-Serum und Protein-freies Medium II waren von der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Germany). Mini-PERM Filter sind von der Firma Heraeus (Hanau). Europium gelabeltes Streptavidin, Enhancement-Lösung und das Photo-Luminometer VICTOR3 wurden von PerkinElmer (Waltham, MT) hergestellt. Alle nicht weiter spezifisch aufgeführten Substanzen wurden von Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Das 3,5-T₂ welches für die Immunisierung der Mäuse benutzt wurde, wurde von Dr. R. Thoma (Formula GmbH Pharmaceutical and Chemical Development Company / Henning Berlin Arzneimittel GmbH, Berlin) synthetisiert. Alle TH-verwandten Substanzen, welche für die Kreuzreaktivitätsstudien benutzt wurden, wurden von Dr. R. Thoma erworben oder freundlicherweise von Dr. T. Scanlan (Oregon Health and Science University, Portland, OR, USA) zur Verfügung gestellt. Die humanen Seren SeraCon II und SeraCon II CD wurden freundlicherweise von der Firma Seracare (Milford, MA, USA) zur Verfügung gestellt. SeraCon II CD ist T₃, T₄ und T₂-frei (99).

Weißer sowie transparente 96 Well Flachboden Maxisorp Mikrotiterplatten wurden von Nunc (Roskilde, Denmark) bezogen.

4.11.2 Antikörper-Biotinylierung

Der anti-Maus IgG Fc-spezifische Antikörper aus der Ziege (GaM Fc-spez. Biotin) wurde mit einem 75-fachen molaren Überschuss des Labelling-Reagenzes Biotin-Amidocaproate-*N*-Hydroxysuccinimideester mit Biotin markiert (129).

4.11.3 Konjugation von 3,5-T₂ an BSA und HRP

Für die Immunisierung musste 3,5-T₂ als Hapten an BSA als Trägermolekül gekoppelt werden. BSA und 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) wurden getrennt in demineralisiertem H₂O gelöst. 3,5-T₂ wurde als eine 10 µM Stocklösung in DMSO gelöst und anschließend mit 0,1 N NaOH verdünnt. Das gelöste 3,5-T₂ wurde mit der BSA-Lösung gemischt und das Kopplungsreagenz EDC tropfenweise zugegeben. Der pH-Wert wurde anschließend auf 9,0 eingestellt. Der Kopplungsansatz wurde bei 4 °C für 24 h gemischt um 3,5-T₂-BSA zu bilden (siehe Abb. 14).

Zur Herstellung des Detektionssystems wurde 3,5-T₂ mit dem EZ-Link Plus Activated Peroxidase Kit über reduktive Amidierung an eine Aldehyd-voraktivierte HRP gekoppelt (siehe Abb. 15). Da 3,5-T₂ lediglich eine Aminogruppe für die Kopplung zur Verfügung stellt wurde 3,5-T₂ in 100-fachem Überschuss eingesetzt. Die Kopplung wurde bei einem pH von 9,4 wie vom Hersteller vorgeschrieben durchgeführt. Die Inkubationszeit wurde auf 20 h bei 4 °C verlängert.

3,5-T₂-BSA- sowie die 3,5-T₂-HRP-Lösung wurden sofort nach Herstellung gegen 50 mM Phosphat-Puffer, unter Nutzung von Slide-A-Lyzer Dialysekassetten, dialysiert um unkonjugiertes 3,5-T₂ zu entfernen. Abschließend wurden beide Lösungen steril filtriert. 3,5-T₂-BSA wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. 3,5-T₂-HRP wurde bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

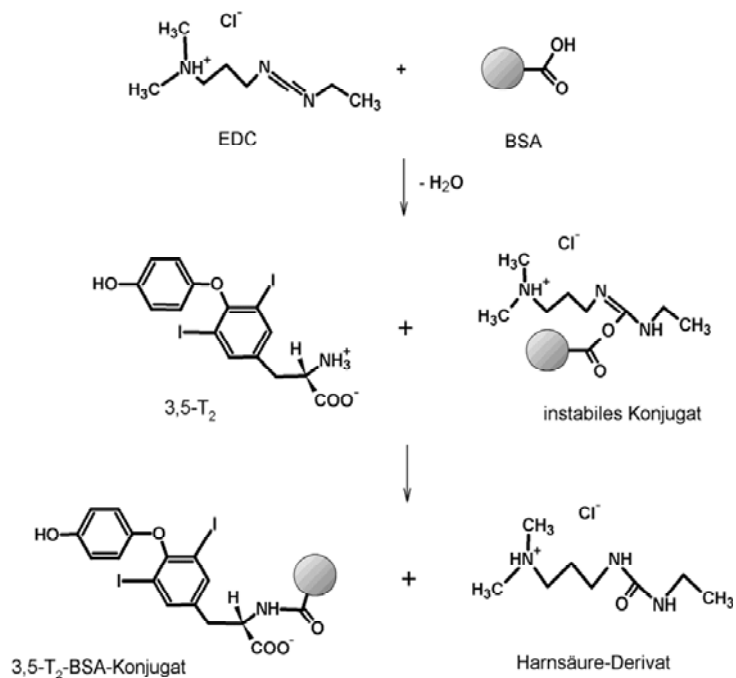


Abb. 14 Reaktionsschema zur Konjugation von 3,5-T₂ an BSA

Herstellung eines Antigens für die Immunisierung.

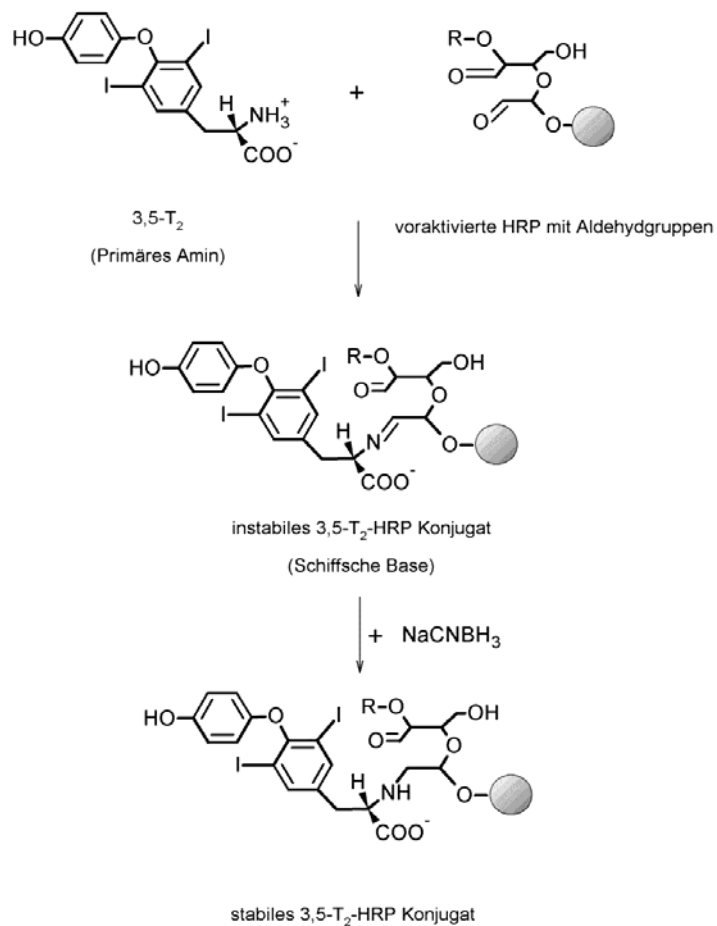


Abb. 15 Reaktionsschema zur Konjugation von 3,5-T₂ an aldehyd-präaktivierte HRP

Herstellung eines Detektionssystem für den kompetitiven CLIA.

4.11.4 Produktion von monoklonalen Antikörpern spezifisch für 3,5-T₂

Für die Immunisierung wurden drei zwei Monate alte weibliche BALB/c Mäuse verwendet. Vor Beginn der Immunisierung wurde Kontroll-Serum durch Schwanzvenenpunktion gewonnen. Entsprechend den Herstellervorgaben wurde 3,5-T₂-BSA mit TiterMax Gold gemischt um die Suspension für die Immunisierung zu komplettieren. Am ersten Tag des Immunisierungsprotokolls wurden alle Mäuse subkutan (s.c.) an 3 - 4 abdominalen Positionen mit je 50 µg Antigen / Maus immunisiert (siehe Abb. 16). Folgeimmunisierungen mit 25 µg Antigen/Maus wurden im Abstand von vier und neun Wochen durchgeführt. Der Titer-Test auf anti-3,5-T₂-BSA Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse wurde vier Wochen nach der zweiten sowie zwei Wochen nach der dritten Immunisierung (entspricht erster und zweiter Folgeimmunisierung) durchgeführt. Die Seren der immunisierten Mäuse wurden auf polyklonale anti-3,5-T₂ sowie anti-BSA Antikörper getestet. Abschließend wurde zwei Mal intraperitoneal (i.p.) mit je 25 µg Antigen / Maus gelöst in PBS behandelt.



Abb. 16 Immunisierungsprotokoll

inklusive der Zeitpunkte für Blut- und Milzentnahme (Angabe in Tagen).

Im Anschluss daran wurde die Milz entnommen und die Immunzellen daraus isoliert (siehe Abb. 17). Isolierte Lymphozyten wurden mit murinen Myelomazellen (PAI) fusioniert um immortalisierte Hybridoma-Zellklone herzustellen (130). Die daraus hervorgehenden Hybridoma Zellen wurden nach höchster Reaktivität mit 3,5-T₂, keine Reaktivität gegen BSA, beste Competition mit unmarkiertem 3,5-T₂ sowie geringer Kreuzreaktivität mit strukturell verwandten TH, TAM und TA ausgesucht. Die so selektierten Hybridoma Zellen wurden durch limitierende Verdünnung subkloniert und expandiert.

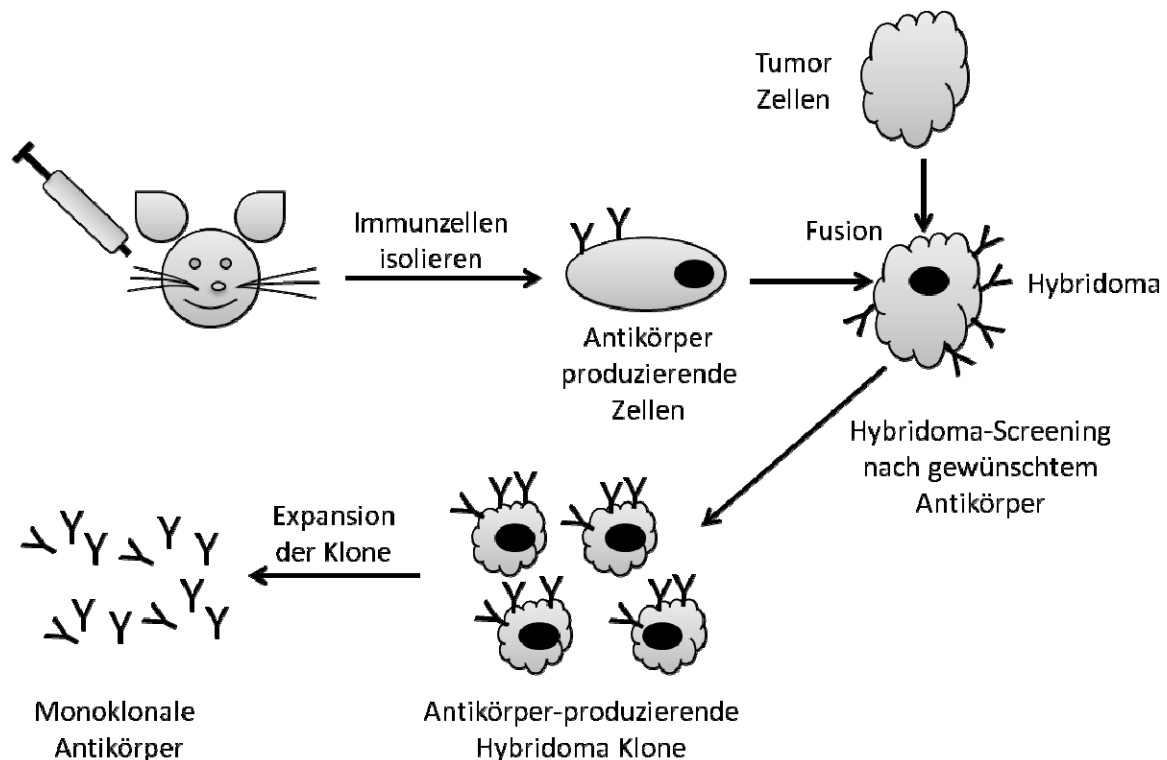


Abb. 17 Schematische Übersicht der Produktion von monoklonalen Antikörpern nach Köhler und Milstein

Mäuse, welche mit dem entsprechenden Antigen immunisiert wurden stellen Antikörper-produzierende Immunzellen her. Diese werden isoliert und im nächsten Schritt mit Tumorzellen (PAI) der gleichen Spezies fusioniert womit immortale Hybridoma entstehen. Anschliessend werden die Hybridoma nach dem gewünschten Antikörper selektiert, expandiert und der monoklonale Antikörper der Wahl aus den Zellkulturüberständen isoliert und aufgereinigt.

4.11.5 Screening Verfahren für Maus Seren und Hybridoma Überstände

Eine 96 Well Maxisorp Mikrotiterplatte wurde entweder mit 10 ng 3,5-T₂-BSA / 0,1 ml oder 10 ng BSA / 0,1 ml Beschichtungspuffer und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Akklimatisierung auf RT wurde die Platte drei Mal automatisch mit PBST (0,05 % Tween20) gewaschen. Maus-Serum wurde 1:1000 im LKC-Assay-Puffer verdünnt. 3,5-T₂-BSA oder BSA beschichtete Platten wurden mit den verdünnten Seren der immunisierten Mäusen oder den Hybridoma Überständen (0,1 ml / Well) für 1,5 h bei RT geschüttelt (siehe Abb. 18). Die Platte wurde erneut drei Mal mit PBST gewaschen. Nachfolgend wurde der Biotin-markierte anti-Maus spezifische Antikörper (GaM Fc-spez. Biotin, 10 ng / 0,1 ml) zugefügt und für 1,5 h bei RT geschüttelt. Der Waschschrift wurde anschließend wiederholt. Dann wurde Streptavidin-Europium (10 ng / 0,1 ml) für 30 min zugegeben. Die Platte wurde abschließend sechs Mal mit PBST gewaschen. Dann wurden 0,2 ml Enhancement Lösung zugegeben und 10 min bei RT geschüttelt. Das Fluoreszenzsignal wurde mit dem VICTOR3 Plattenmessgerät detektiert.

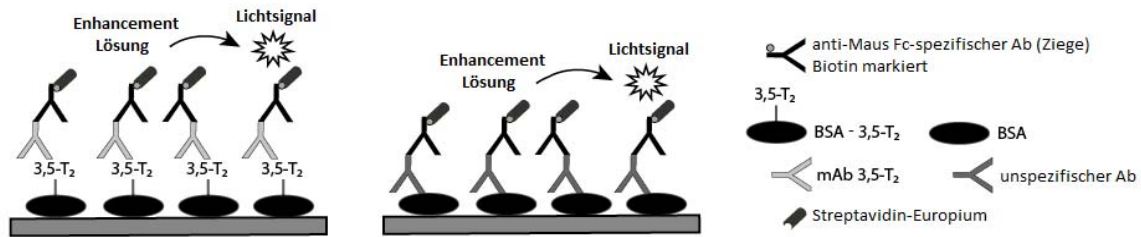


Abb. 18 Kombination zweier Screening-Assays um 3,5-T₂ spezifische mAb von unspezifischen mAb zu unterscheiden

4.11.6 Bestimmen der Immunglobulin Subklasse und Aufreinigung der mAb

Die Subklasse der mAb wurde mit einem kommerziellen Kit getestet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In Abhängigkeit der mAb Subklasse wurden die mAb mit einem entsprechenden Protokoll und einer rProtein A- Sepharose Säule über die FPLC aufgereinigt. Der Zellkulturüberstand zweier 100 ml Zellkulturflaschen mit dem entsprechenden Hybridoma-Klon wurden bei 4.000 rpm für 20 min abzentrifugiert und steril filtriert. Der pH wurde für mAb der Klassen IgG_{2a} und IgG_{2b} auf 8,2 eingestellt. Für die mAb Subklasse IgG₁ wurde NaCl in einer Konzentration von 166,5 g/l zugegeben und der pH auf 8,9 eingestellt. Das Gesamtvolumen wurde auf 200 ml mit dem entsprechenden Ladepuffer aufgefüllt. Die rProtein A-Säule wurde zuerst in 50 ml Ladepuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand durch eine Pumpe (2 ml / min für 100 min) auf die Säule geladen. Die Säule wurde anschließend mit 60 ml Ladepuffer gewaschen und die IgG danach mit dem gleichen Volumen Elutionspuffer eluiert. Die IgG werden fraktioniert gesammelt. Speziell für IgG_{2b} wird Neutralisierungspuffer in alle Reaktionsgefäße der Fraktionierung vorgelegt. Die Säule wird abschließend in PBS 0,02 % NaN₃ äquilibriert. Fraktionen bei denen die FPLC einen Peak für IgG angezeigt hat werden vereinigt und die Proteinkonzentration durch eine Dichtemessung bestimmt.

4.11.7 Ultrasensitiver Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA)

Weißer 96 Well Flachboden-Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4 °C mit 75 ng GaM Fc-spez. Ab verdünnt in Beschichtungspuffer beschichtet. Die Platten wurden drei Mal mit PBST (0,05 % Tween20) gewaschen und für 1 h bei RT mit 1 % BSA-PBST (0,02 % Tween20) blockiert. Der Waschschriff wurde wiederholt. 3,5-T₂ Standards (0 - 10 nM) verdünnt in SeraCon II CD Serum, sowie Serum Proben (je Well 25 µl) wurden auf die Platte in Zweifach-Bestimmung aufgetragen. Sofort danach wurden 4 ng / Well mAb 4F8 verdünnt in 1:1 0,5 % BSA-PBST / low cross buffer (LCB) zugegeben. Die Platten wurden zur Durchmischung des Wellinhaltes 5 min bei RT geschüttelt und anschließend ON bei 4 °C ohne Schütteln gelagert. Nach dieser Vorinkubation wurden 0,2 ng 3,5-T₂-HRP als Detektionsdetergenz zugesetzt. Die Platte wurde zur Durchmischung für 5 min bei RT geschüttelt und anschließend 1 h bei 4 °C ohne Schütteln gelagert. Nach einem finale Waschschriff

(sechs Mal mit PBST) wurden 50 µl / Well Chemilumineszenz-Substrat zugefügt und für eine Minute geschüttelt. Das Chemilumineszenz-Signal wurde im VICTOR3 Multilabel-Counter gemessen. Als interne Kontrollen wurden kommerziell erhältliche Seren verwendet (Seracare 'Seracon II', Biorad 'Lyphocheck', PAN-Biotech 'human serum off the clot').

4.11.8 3,5-T₂ Immunoassay-Validierung

Die Kalkulation des Detektionslimits beruht auf der theoretischen Messung des 3,5-T₂s in der Analyt-freien Serummatrix. Zum Mittelwert (n=24 Einzelmessungen) des Assay-Blankwertes wird der dreifache Wert der Standardabweichung dazu gerechnet. Die Intra-Assay Variation wurde bestimmt, indem vier individuelle humane Seren vermessen wurden (n=12 Einzelmessungen auf einer Platte, 3,5-T₂ Konzentrationen im Bereich 0,5 – 1,5 nM). Die Inter-Assay Variation wurde durch die Vermessung von drei individuellen humanen Seren (0,5 – 1,5 nM 3,5-T₂) während einer Serie von 15 verschiedenen Platten an verschiedenen Tagen bestimmt. Für die Bestimmung der Assay Präzision wurden fünf verschiedene humane Seren mit niedriger, mittlerer und hoher Analytkonzentration mit 3,5-T₂ versetzt. Zusätzlich wurden fünf humane Seren mit nachgewiesenen hohen Analytkonzentration seriell mit Analyt-freier Serum-Matrix verdünnt. Die Linearität der Verdünnung wurde berechnet, indem die gemessene 3,5-T₂ Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wurde, gefolgt von einem direkten Vergleich mit der Analytkonzentration im unverdünnten Serum. Die Kreuzreaktivität des 3,5-T₂ Chemilumineszenz-Immunoassays wurde bestimmt indem bekannte Konzentrationen von strukturell ähnlichen TH, TAM und TA (10 - 250 nM) verdünnt in Serum-Matrix im Immunoassay vermessen wurden und als 3,5-T₂-äquivalente Assay-Antwort ausgewertet wurden (% Reaktivität).

4.11.9 Klinische Kollektive

Es wurden im Rahmen der Charakterisierung des 3,5-T₂ Immunoassays verschiedene Kollektive mit unterschiedlichen Fragestellungen vermessen um erste Daten zur Relevanz von 3,5-T₂ im humanen Serum zu bestimmen. Alle Einverständniserklärungen der Patienten sind vorhanden und die Studien wurden nach den Richtlinien der lokalen Ethikkomites durchgeführt.

a) Euthyreote Referenzpopulation

Grundlage der Untersuchung endogener 3,5-T₂ Serum Konzentrationen in Schilddrüsen-gesunden Individuen lieferte die Vermessung von 1000 Proben als Subpopulation aus der Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND (131)). Bei 108 Probanden konnte kein 3,5-T₂ im Serum bestimmt werden, da die Werte unterhalb des Detektionslimits des CLIA lagen. Des Weiteren wurden 132 Probanden wegen einem der folgenden Gründe aus der Auswertung der Daten ausgeschlossen: Schilddrüsenhormonmedikation (n=94), Serum TSH ausserhalb des Referenzbereichs (0,3 - 3,59 mU/l,

n=54), keine Angaben in einem der untersuchten Parameter (n=5) oder wenn die gemessenen 3,5-T₂ Konzentrationen mehr als die 2-fache Standardabweichung entfernt vom allgemeinen Mittelwert entfernt waren (> 2,13 nM, n=10). Die Studienpopulation besteht aus 761 Probanden.

b) Primäre Schilddrüsenerkrankungen

Hyper-/Hypothyreose - Von Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen wurden klinische Proben gesammelt und anhand der Initialdiagnose in die Gruppen Hypothyreose (8 männlich and 23 weiblich; 20-84 Jahre, BMI 17,5 - 45,2, fT₄ 5,7 ± 0,6 pM, fT₃ 2,9 ± 0,2pM, TSH 65,1 ± 7,8 mU/l) oder Hyperthyreose (5 männlich and 19 weiblich, 21 - 75 Jahre, BMI 16,8 - 35,6, fT₄ 43,3 ± 4,5 pM, fT₃ 19,1 ± 1,9 pM, TSH 0,01 ± 0,0 mU/l) aufgeteilt (Prof. Dr. Marek Ruchala, Department of Endocrinology, Metabolism and Internal Medicine, University of Medical Sciences, Poland). Die hypothyreote Gruppe beinhaltet 23 Patienten mit Hashimoto Thyreoditis sowie neun Patienten mit post-ablativer ¹³¹Iod induzierten Hypothyreose. Die hyperthyreote Gruppe enthält 18 Patienten mit Graves Orbitopathie sowie sechs Patienten mit toxischer nodulärer Struma.

Thyroidektomiert + Thyroxin-Medikation - Eine weitere klinische Kohorte (Prof. Dr. Georg Brabant Experimental and Clinical Endocrinology, Universität Lübeck) bestand aus 100 thyroidektomierten Schilddrüsenkrebs-Patienten die unter TSH-suppressiver Thyroxin-Therapie stehen (78 weiblich and 22 männlich, 18-84 Jahre). Diese Patienten-Gruppe setzte sich aus 73 Individuen mit papillärem, 21 mit follikulärem, zwei mit Hürthle Zell-, und vier mit medullärem Schilddrüsenkarzinom zusammen. Als gesunde Kontrollgruppe dienen 99 gesunde Individuen gleichen Alters (± 2 Jahre) und Geschlechts aus der Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND) (131).

c) Sekundäre Schilddrüsenerkrankung

Dialysepflichtige Nierenkranke – Dieses Kollektiv wurde von Prof. Dr. Joao Anselmo (Department of Endocrinology & Nutrition, Hospital of Divino Espirito Santo, Ponta Delgada, Portugal) zur Verfügung gestellt. Es umfasst 61 Patienten, 38 männlich und 23 weiblich im Alter von 19-84 Jahren. Alle sind seit 2-19 Jahren dialysepflichtig. Die zugrundeliegenden Diagnosen umfassen hypertensive Nephroangiosklerosis (17 Personen), diabetische Nephropathie (14 Personen), chronische Glomerulonephritis (4 Personen), verschiedene andere Erkrankungen (11 Personen) sowie 13 Patienten mit nicht aufgeklärter Diagnose. Dieses Kollektiv beinhaltet ebenfalls eine kleine Kontrollpopulation (n=6, 4 männlich, 2 weiblich, 41-76 Jahre) mit gemischtem diagnostischen Hintergrund (n=3 Dyslipidemie, n=2 Diabetes Typ 2, n=1 Adipositas) aber ohne Dialysepflicht. FT₃ und fT₄ sowie TSH-Bestimmungen waren bereits vorhanden. 3,5-T₂ (CLIA) und rT₃ (RIA) wurden zusätzlich bestimmt.

4.11.10 Statistische Analysen

Die Standardkurve zur Kalkulation der 3,5-T₂ Serum Konzentrationen wurde an eine sigmoidale Dosis-Response Kurve mit variabler Krümmung (mathematische Anpassung vierter Ordnung) im Programm GraphPad Prism Version 5.01 angepasst. Die 3,5-T₂ Serum Konzentrationen der hypo- und hyperthyreoten Patienten wurden für Alter und BMI adjustiert, gefolgt von einer univariaten Varianzanalyse mit SPSS Statistics Version 19.0.1 (IBM). Für alle anderen statistischen Tests wurde GraphPad Prism Version 5.01 genutzt. Angaben von relativen Wiederfindungsraten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die jeweiligen statistischen Tests sind in den zugehörigen Abbildungen näher beschrieben. Unterschiede zwischen Gruppen werden als signifikant gekennzeichnet, wenn $P < 0,05$.

5. Ergebnisse

5.1 Glukoregulatorische Funktion von 3-T₁AM und seinen Metaboliten

In Tierversuchen konnten die glukoregulatorischen Effekte (Hypoinsulinämie, Hyperglykämie und Hyperglukagonämie) des 3-T₁AMs, nach Applikation in pharmakologischer Dosierung, beschrieben werden. Zusätzlich zu plasmamembranständigen Rezeptoren sind Mitochondrien zelluläre Zielstrukturen für 3-T₁AM. In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die 3-T₁AM-vermittelte Regulation der mitochondrialen Aktivität zu der beschriebenen Hypoinsulinämie beiträgt. Darin inbegriffen sind die Charakterisierung der zellulären 3-T₁AM-Aufnahme sowie dessen intrazellulärer Metabolismus.

5.1.1 Zytotoxizitäts-/Zellviabilitäts-Assay

Bevor mit den eigentlichen Expositions-Versuchen begonnen werden konnte musste sicher gestellt werden, dass 3-T₁AM sowie TA₁ nicht akut zytotoxisch auf das verwendete Zellsystem wirken. Diesbezüglich ist sowohl die Expositionszeit als auch die verwendete Substanzkonzentration zu prüfen.

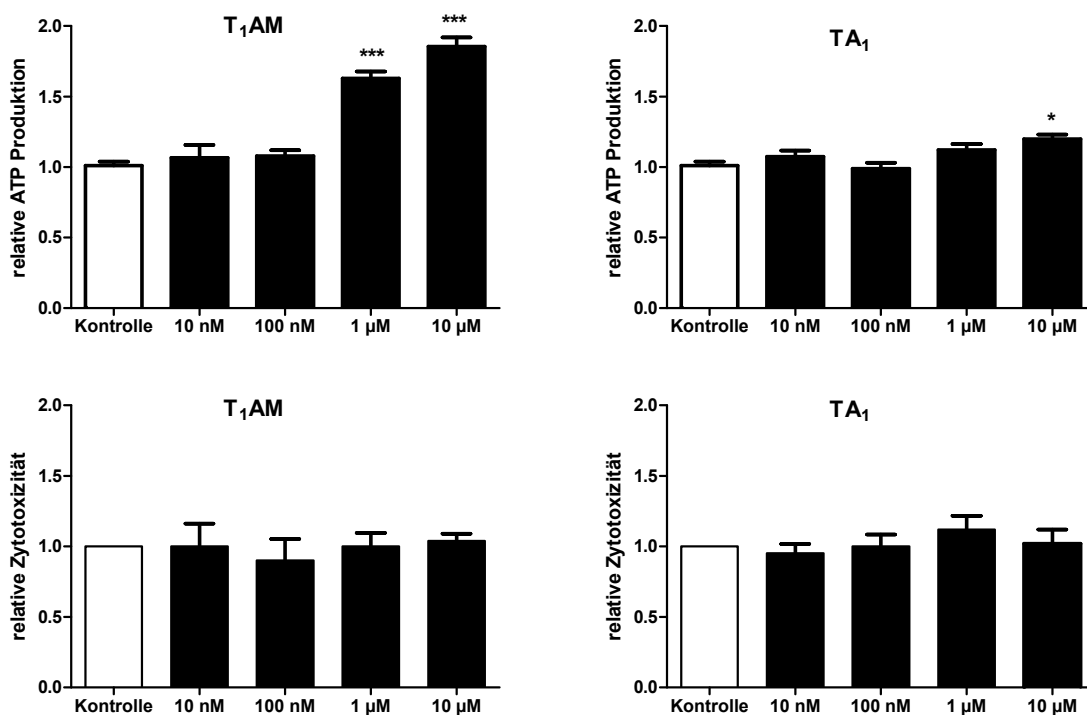


Abb. 19 Zytotoxizitäts- und Zellviabilitätstest

MIN6 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen 3-T₁AM oder TA₁ (10 nM – 10 μM) behandelt um die akute Toxizität der Substanzen für die gewählte Zelllinie zu untersuchen. Datendarstellung Mittelwert ± SEM. Statistik: One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test); * P<0,05, *** P<0,001. Daten sind Ergebnisse von zwei (Zellviabilität, oben) bzw. drei (Zelltoxizität, unten) unabhängigen Versuchen. Jede Inkubation wurde mit sechs Wells pro Gruppe und Substanzkonzentration durchgeführt. Die Lösungsmittelkontrolle enthält die gleiche Menge DMSO wie die Substanzinkubationen.

3-T₁AM sowie die korrespondierende Essigsäure TA₁ wurden im Konzentrationsbereich 10 nM bis 10 µM getestet. Es wurden akute 3-T₁AM-Stimulationsversuche im weiteren Verlauf durchgeführt (0,5 – 2 h Exposition), da die Effekte auf den Glukosehaushalt in den Tierversuchen im gleichen Zeitrahmen eintraten (110, 111). Im MTT-Zytotoxizitätsassay (insgesamt 4 h Exposition, Abb. 19 unterer Bereich) konnte keine signifikant verminderte Zellviabilität festgestellt werden. Die Effekte beider Substanzen waren vergleichbar mit der Lösungsmittelkontrolle. Da dieser NADH/NADPH-abhängige Assay wenig sensitiv ist, zumal die Expositionszeit begrenzt war, wurde ein zweiter ATP-sensitiver Zellviabilitätsassay durchgeführt. Es wurde erwartet, dass mit steigender Substanzkonzentration der Anteil lebender Zellen unter 100 % fällt, falls 3-T₁AM oder TA₁ zytotoxisch wirken. Das Gegenteil wurde aber beobachtet. Hohe Konzentrationen 3-T₁AM (1-10 µM) steigerten die intrazelluläre ATP-Produktion auf das Doppelte. Geringere Konzentrationen der gleichen Substanz (10, 100 nM) hatten dagegen keinen Effekt auf die ATP-Produktion. Die direkte Exposition mit TA₁ zeigte lediglich bei 10 µM eine ca. 20 %ige Steigerung der ATP-Produktion.

ATP ist einer der Signalmetaboliten, welcher die Insulinsekretion beeinflussen kann (132). 3-T₁AM Konzentrationen > 100 nM können zu einer Hyperinsulinämie durch erhöhte ATP-Werte beitragen, was im Gegensatz zu Tierversuchsdaten steht. In allen weiteren Zellkulturversuchen werden deswegen nicht mehr als 100 nM 3-T₁AM verwendet.

5.1.2 Transporter- und Enzymexpression in MIN6 Zellen und pankreatischen Inselzellen der Maus

Die primären Inseln der Maus wurden nach einem modifizierten Protokoll von Gotoh *et al.* (1985) am Deutschen Institut für Ernährungsforschung / Abteilung Experimentelle Diabetologie durch Dr. O. Kluth aus der Maus gewonnen, RNA isoliert und die cDNA für die qPCR Analyse freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Aufgrund der geringen Konzentration der einzelnen Präparationen wurde die cDNA von 4-6 Tieren gepoolt, so dass drei individuelle cDNA-Pools mit gleicher cDNA Konzentration entstanden.

5.1.2 a) 3-T₁AM-Aufnahme

Damit TH und deren Metabolite an den Mitochondrien wirksam werden können, müssen sie zuerst über die Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden. Die Aufnahme der TH und ihrer Metabolite wird in den überwiegenden Fällen durch TH-Transporter bewerkstelligt. Die Transporter für 3-T₁AM sind nicht bekannt, weswegen ein Transporter-Screening durchgeführt wurde. MIN6 Zellen exprimieren überwiegend Mct10 und Lat1 (siehe Abb. 20). Lat2 ist nur in geringer Menge vorhanden und Mct8 ist gar nicht exprimiert. In pankreatischen Inselzellen ist Mct8 ebenfalls vernachlässigbar gering exprimiert im Vergleich zu allen anderen nachgewiesenen Transportern.

Lat1 ist wie in den MIN6 Zellen stark exprimiert, wohingegen die Lat2-Expression deutlich ausgeprägter ist als es in MIN6 nachweisbar war. Mct10 ist in pankreatischen Inseln stärker exprimiert als in MIN6, jedoch mit großer Mct10 Variation zwischen den drei verschiedenen Pools.

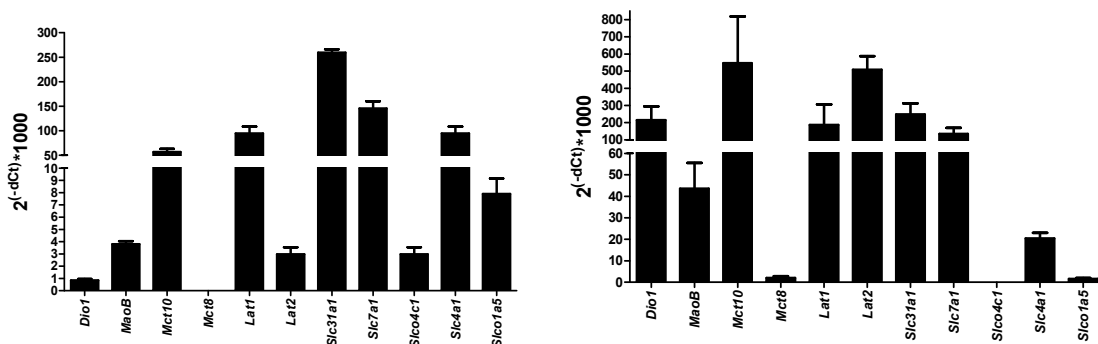


Abb. 20 Enzym- und Transporterexpression von MIN6 Zellen (links) und murinen Langerhansschen Inseln (rechts)

RNA aus MIN6 Zellen wurde aus technischen Triplikaten drei aufeinanderfolgender Passagen isoliert. Primäre Langerhanssche Inseln der Maus wurden zu drei gleichwertigen Pools vereinigt und analysiert. Datendarstellung als Mittelwert \pm SEM.

Tabelle 15 Transporter-Expressions-Analyse (in silico) im humanen (Hs.) und murinen (Mm.) Pankreas

3-T ₁ AM Kandidaten	Transporter	Kurzform	Gen-Name	Transkripte / Million	Gene EST / Total EST im Organ-Pool
kationischer Aminosäure- Transporter		Slc7a1	Mm.275489	178	19 / 106259
		SLC7A1	Hs.14846	42	9 / 213440
Monocarboxylat-Transporter		Slc16a7	Mm.29161	-	-
		SLC16A7	Hs.88156	-	-
Anionen/Zucker-Transporter		Slc17a5	Mm.46932	-	-
		SLC17A5	Hs.597422	46	10 / 213440
organischer Anionentransporter		Slco3a1	Mm.425467	18	2 / 106259
		SLCO3A1	Hs.311187	107	23 / 213440
organischer Anionentransporter		Slco4a1	Mm.133687	-	-
		SLCO4A1	Hs.235782	28	6 / 213440
Nukleosid-Transporter		Slc29a2	Mm.4930	-	-
		SLC29A2	Hs.569017	28	6 / 213440
Kupfer-Transporter		Slc31a1	Mm.248637	65	7 / 106259
		SLC31A1	Hs.532315	42	9 / 213440
System-L-ähnlicher Aminosäure-Transporter		Slc43a3	Mm.290729	-	-
		SLC43A3	Hs.99962	23	5 / 213440

Des Weiteren wurde eine Pankreas-spezifische Expressionsanalyse (in silico) für publizierte (110) potenzielle 3-T₁AM-Transporter in Maus und Mensch durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG>, EST-profile, siehe Tabelle 12). Dafür wurde eine NCBI-Datenbank benutzt, in welcher „*expressed sequence tags*“ (EST) zusammengefasst sind. EST sind kurze DNA-Abschnitte, die durch teilweise Sequenzierung von cDNAs gewonnen werden. Sie repräsentieren damit einen Ausschnitt der Sequenz von Genen im betrachteten Lebewesen, Gewebe oder Zelltyp und lassen Rückschlüsse auf deren Expression zu.

Es zeigte sich, dass die Verteilung zwischen den Spezies sehr heterogen ist (siehe Tabelle 12). Slc16a7 / SLC16A7 ist im Pankreas in keiner der beiden Spezies vorhanden. Dagegen ist ein Teil der Transporter lediglich im Menschen, jedoch nicht in der Maus vorhanden (SLC17A5, SLCO4A1, SLC29A2, SLC43A3). Sie wurden daraufhin für die murinen Expressionsanalysen erst einmal zurück gestellt. Drei Kandidaten-Transporter waren in beiden Spezies vorhanden und wurden für die Expressionsanalyse heran gezogen (Slc7a1, Slc3a1, Slc31a1). Slc3a1 konnte weder in MIN6 noch in murinen pankreatischen Inselzellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 20). In MIN6 Zellen waren Slc7a1 und Slc31a1 im Vergleich zu allen anderen TH-Transportern am höchsten exprimiert. In Langerhansschen Inseln war nur die Lat2 und Mct10-Expression stärker ausgeprägt. Es wurden weitere Transporter untersucht, die in der Literatur mit TH Transport in Verbindung gebracht wurden. OATP-14 (Slco4c1) ist in Langerhansschen Inseln gar nicht und in MIN6 Zellen vernachlässigbar gering exprimiert. OATP-3 (Slco1a5) ist im Zellsystem mäßig exprimiert, aber in isolierten Inselzellen kaum vorhanden. Die Slc4a1-Expression ist in der Zelllinie hoch, im murinen Pankreas dagegen moderat exprimiert.

5.1.2.b) 3-T₁AM-Metabolismus

Des Weiteren wurde die Enzym-Ausstattung beider Modelle untersucht. 3-T₁AM kann nach erfolgter Aufnahme in die Zelle sowohl durch Deiodasen als auch durch Aminoxidasen umgesetzt werden (40). Um 3-T₁AM in Position 3 zu dejodieren und so T₀AM als jodfreies Produkt zu erhalten ist die Expression und Aktivität von Dio3 notwendig (38). In MIN6 Zellen sowie pankreatischen Inselzellen ist jedoch weder Dio2 noch Dio3 nachweisbar (siehe Abb. 20). Dio1 ist in MIN6 sehr gering exprimiert im Gegensatz zu einer großen Menge Transkript in Langerhansschen Inseln. 3-T₁AM ist ausserdem Substrat der Monoaminoxidasen (Mao), wobei MaoA und MaoB unterschieden werden. Im Zellmodell sowie in den isolierten Pankreas-Inseln ist die MaoB vorhanden, jedoch die MaoA Expression nicht nachweisbar. Wenn 3-T₁AM unter den gewählten Versuchsbedingungen ein Substrat für MaoB darstellt, so ist der Umsatz zur korrespondierenden Essigsäure TA₁ zu erwarten (siehe 5.1.3).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Zellsystem MIN6 und isolierte Inselzellen des Pankreas eine vergleichbare Ausstattung an Enzymen und Transportern aufweisen. Die Expressionsstärke ist in den pankreatischen Inselzellen deutlich höher, jedoch handelt es sich dabei auch nicht um reine Kulturen von ausschließlich β -Zellen. Die Daten zeigen, dass es ähnliche Voraussetzungen für den Metabolismus von 3-T₁AM *in vivo* und *in vitro* gibt.

5.1.3 3-T₁AM-Aufnahme und intrazellulärer Metabolismus in MIN6-Zellen

Es ist bereits beschrieben worden, dass Mitochondrien intrazelluläre Zielstrukturen für 3-T₁AM sind (108, 133). Um in pankreatischen β -Zellen die Mitochondrien zu erreichen muss deren Aufnahme und Akkumulation in der Zelle als Voraussetzung nachgewiesen werden. 3-T₁AM-Aufnahme in die Zelle und Bindung an die Plasmamembran können durch Zellextraktion nicht voneinander getrennt betrachtet werden. Der Metabolismus des 3-T₁AM durch intrazelluläre Enzyme wie Dio oder Mao beweist indirekt die Aufnahme der Substanz. In Folgeexperimenten muss aber durch gezielte enzymatische Hemmung sichergestellt werden, dass 3-T₁AM-Effekte nicht von einem seiner Abbauprodukte hervorgerufen werden oder beeinflusst sind.

Die LC-MS/MS-Messmethode zur Bestimmung von 3-T₁AM und seinen Metaboliten in Zellen und Zellkulturüberständen wurde im Institut für Experimentelle Endokrinologie im Rahmen einer anderen Dissertation entwickelt (Dr. Carolin S. Höfig) und für die Analysen dieser Doktorarbeit angewendet. Die LC-MS/MS Analytik wird fortlaufend weiterentwickelt und die notwendige Validierung ist noch nicht abgeschlossen. Sie ist geeignet für die quantitative mechanistische Analyse, direkte Massebilanzen sind aber nicht möglich.

In dem dargestellten exemplarischen Chromatogramm der LC-MS/MS kann man sehen, dass nach 20 min 3-T₁AM Inkubation in MIN6-Zellen 3-T₁AM selbst, sowie der korrespondierende Essigsäure-Metabolit TA₁ nachweisbar ist (siehe Abb. 21).

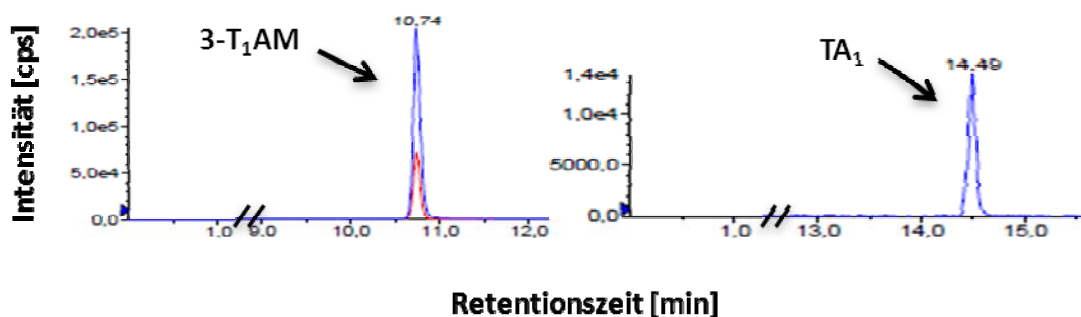


Abb. 21 Repräsentatives Chromatogramm für 3-T₁AM und TA₁ in extrahierten MIN6-Zellen

In extrahierten MIN6-Zellen, die mit 100 nM 3-T₁AM für 20 min inkubiert wurden konnte 3-T₁AM selbst (links) sowie dessen Metabolit TA₁ (rechts) nach Retentionszeit getrennt nachgewiesen werden. Weitere Metabolite des 3-T₁AM (T₀AM, TA₀) konnten nicht nachgewiesen werden. Die LC-MS/MS Analyse wurde im Negativ-Modus durchgeführt.

Dieses erste Ergebnis legte nahe, dass 3-T₁AM die Plasmamembran überwinden kann. Ob dies transporter-vermittelt oder –unabhängig geschieht bleibt zu klären. Ebenso ob ein oder mehrere Transporter daran beteiligt sind. In der Zelle ist nach 3-T₁AM Exposition TA₁ messbar. Da MIN6 Zellen MaoB und nicht MaoA exprimieren muss dieser Metabolismusschritt MaoB abhängig sein. Ein anteiliger Efflux von TA₁ kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. TA₁ ist der einzig nachweisbare Metabolit. Aufgrund der fehlenden Dio3-Expression in MIN6 Zellen (siehe 1.5.2 b) konnte keine Deiodierung von 3-T₁AM zu T₀AM mittels LC-MS/MS festgestellt werden. TA₀ als weiteres Dio-Produkt von TA₁ war ebenfalls nicht nachweisbar.

In einem statistisch gesicherten Folgeversuch (n=3) wurden MIN6-Zellen mit je 100 nM 3-T₁AM über einen Zeitraum bis 30 min stimuliert.

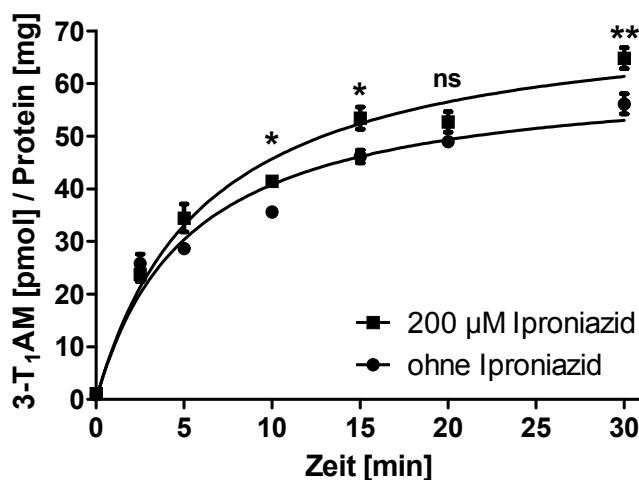


Abb. 22 Kombierter 3-T₁AM Bindungs- und Aufnahmeassay

MIN6 Zellen wurden mit 100 nM 3-T₁AM für 0 - 30 min ± 200 µM Iproniazid als Mao-Inhibitor inkubiert. Die extrahierten Zelllysate wurden auf ihre 3-T₁AM-Konzentration mittels LC-MS/MS im Positiv-Modus analysiert. Datendarstellung als technische Triplikate dreier unabhängiger Experimente als Mittelwert ± SEM. Statistik: zweiseitiger t-Test je Zeitpunkt; ** P<0,01, * P<0,05, ns = nicht signifikant. Datenanpassung: einseitig-spezifische Bindung.

Endogen enthalten die Zellen keine messbaren 3-T₁AM-Mengen (Zeitpunkt 0 min, siehe Abb. 22). Bereits nach 2.5 min ist die 3-T₁AM-Konzentration im Zelllysate deutlich angestiegen (ca. 20 pmol 3-T₁AM / mg Protein). Mit jedem gemessenen Zeitpunkt steigt die Konzentration weiter bis annähernd 60 pmol 3-T₁AM / mg Protein. Die gemessene 3-T₁AM-Menge im Zelllysate ist abhängig von der An- oder Abwesenheit des Mao-Inhibitors Iproniazid. Bei Mao-Inhibition ist der 3-T₁AM Gehalt im Zelllysate ab 5 min deutlich und ab 10 min signifikant erhöht. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen wird über den Zeitverlauf sukzessiv größer. Aus dieser Analyse kann geschlossen werden, dass 3-T₁AM MaoB-abhängig zu TA₁ umgesetzt wird. MIN6 Zellen enthalten endogen TA₁ (2 pmol / mg Protein, siehe Abb. 23). Im Zelllysate ist bereits 2.5 min nach Zugabe von 100 nM 3-T₁AM doppelt so viel TA₁ messbar. Nach 10 min ist ein TA₁-Konzentrationsmaximum von im Zelllysate messbar (6 pmol / mg Protein) was einer Verdreifachung der endogenen TA₁ Menge entspricht. Nach 15 – 30 min fällt die

gemessene Zellkonzentration wieder auf den Wert vor 10 min ab. Die TA₁ Konzentration in den Zellen bleibt signifikant erhöht über die Zeit. Unter Iproniazid-Behandlung bleibt die TA₁ Konzentration im Zelllysate über 30 min stabil und ist vergleichbar mit der endogenen TA₁-Konzentration.

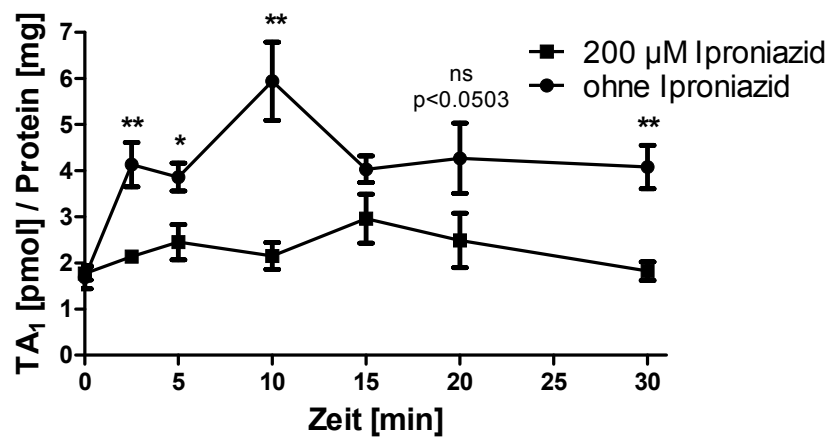


Abb. 23 3-T₁AM abhängige Bildung von TA₁ in MIN6-Zellen

MIN6 Zellen wurden mit 100 nM 3-T₁AM für 0-30 min ± 200 µM Iproniazid als Mao-Inhibitor inkubiert. Die extrahierten Zelllysate wurden auf ihre TA₁-Konzentration mittels LC-MS/MS im Negativ-Modus analysiert. Datendarstellung als technische Triplikate dreier unabhängiger Experimente als Mittelwert ± SEM. Statistik: zweiseitiger t-Test je Zeitpunkt; ** P<0,01, * P<0,05, ns = nicht signifikant.

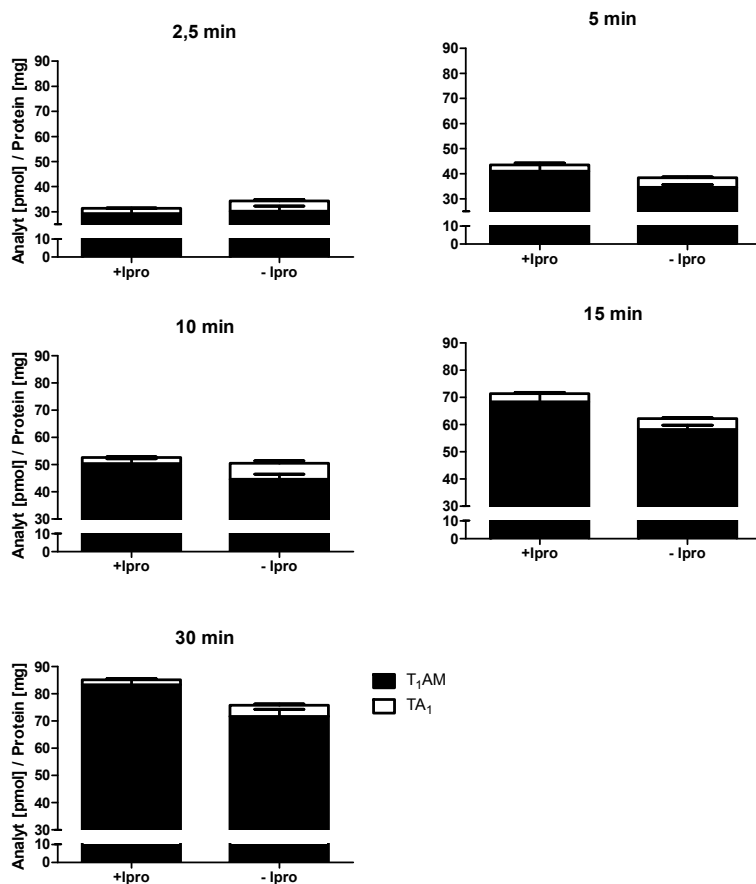


Abb. 24 Vergleichende Darstellung des intrazellulären Abbaus von 3-T₁AM und des Umsatzes zu TA₁ in MIN6 Zellen

Dargestellt ist die zunehmende Bindung bzw. Aufnahme von 3-T₁AM über die Expositionszeit. Präinkubation mit Iproniazid verhindert den Umsatz von 3-T₁AM zu TA₁. Die TA₁-Konzentration im Zelllysate kann dem Abbau von 3-T₁AM nicht vollständig erklären.

In Abbildung 24 ist der zeitliche Verlauf für 3-T₁AM und TA₁ vergleichend in jeweils einem Balken pro Zeitpunkt dargestellt und \pm Mao-Inhibitor (Ipro = Iproniazid) gruppenspezifisch aufgetrennt. Man sieht, dass im Zelllysate zu Beginn (2,5 min) gleich viel 3-T₁AM in beiden Gruppen messbar war und ungefähr die doppelte Menge TA₁ in der Gruppe ohne Iproniazid vorhanden ist. Nach 10 min kann man sehen, dass die geringere Menge 3-T₁AM in der Gruppe ohne Iproniazid durch die zelluläre Menge an TA₁ nahezu vollständig kompensiert wird. Dies ist der Zeitpunkt wo die TA₁ Konzentration im Zelllysate am höchsten ist. Bei fortdauernder Exposition der Zellen mit 100 nM 3-T₁AM kann die zelluläre TA₁-Menge den 3-T₁AM-Unterschied zwischen den Gruppen \pm Iproniazid nicht mehr vollständig ausgleichen. Da TA₁ bislang der einzige nachweisbare Metabolit war, wurde vermutet, dass TA₁ aus der Zelle exportiert wird. Deshalb wurden Zellkulturüberstände aus demselben Versuch auf 3-T₁AM und TA₁ in der LC-MS/MS untersucht. Ein Transporter für den TA₁-Efflux ist noch nicht beschrieben. In den Zellkulturüberständen war bis nach 5 min Exposition mit 100 nM 3-T₁AM keine TA₁ nachweisbar (siehe Abb. 25). Ab 10 min, entsprechend dem intrazellulären TA₁ Konzentrationsmaximum, ist auch in den Zellkulturüberständen TA₁ messbar. Bis zum letzten

Zeitpunkt (30 min) steigt die TA₁ Konzentration in den Zellkulturüberständen ohne Iproniazid weiter linear an. Die gebildete Menge TA₁ entspricht ungefähr der 3-T₁AM-Konzentration, die ohne Mao-Inhibition intrazellulär weniger vorhanden ist im Vergleich zu der Iproniazid-behandelten Gruppe. In den Zellkulturüberständen, die mit Iproniazid vorinkubiert wurden konnte zu keinem Zeitpunkt TA₁ nachgewiesen werden.

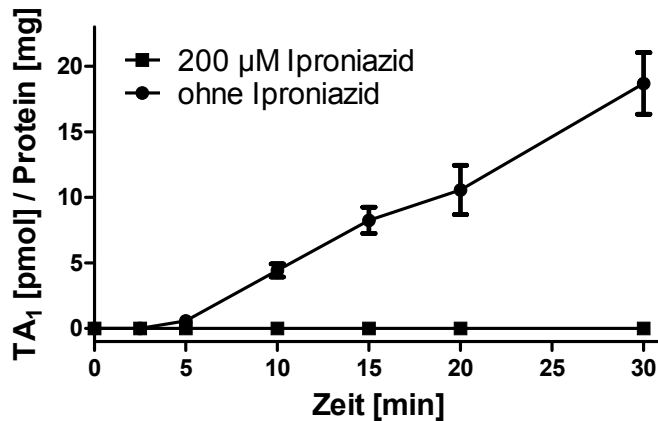


Abb. 25 LC-MS/MS Analyse des TA₁-Exports aus MIN6-Zellen nach 3-T₁AM Exposition

MIN6 Zellen wurden mit 100 nM 3-T₁AM für 0-30 min ± 200 µM Iproniazid als Mao-Inhibitor inkubiert. Die extrahierten Zellkulturüberstände wurden auf ihre TA₁-Konzentration mittels LC-MS/MS im Negativ-Modus analysiert. Wurden die Zellen mit Iproniazid vorinkubiert, so konnte zu keinem Zeitpunkt TA₁ nachgewiesen werden (Null-Wert). In der Vergleichsgruppe stieg die TA₁-Konzentration im Zellkulturüberstand nach 5-10 min linear an. Datendarstellung als technische Triplikate dreier unabhängiger Experimente als Mittelwert ± SEM.

Parallel zu der TA₁ Detektion im Zellkulturüberstand wurde auch die Abnahme des 3-T₁AMs im Zellkulturüberstand untersucht. Zu Beginn der 3-T₁AM Exposition sind im Zellkultur-Medium bereits nur noch wenige pmol 3-T₁AM nachweisbar. Nach 2,5 min ist im Zelllysats bereits eine doppelt so hohe 3-T₁AM-Konzentration messbar verglichen mit dem Zellkulturmedium. Obwohl es eine starke Zunahme des 3-T₁AMs in den Zellen gibt (0 – 90 pmol innerhalb von 30 min), sinkt der 3-T₁AM-Gehalt im Zellkulturüberstand nur marginal von 16 auf 10 pmol in der gleichen Zeit ab. Eine Erklärung könnte sein, dass es sofort nach 3-T₁AM Exposition zur Bindung der Substanz an Oberflächenstrukturen der Zelle kommt. Dabei ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen (± Iproniazid) betreffend der 3-T₁AM Konzentration im Medium nicht durchgängig und nur schwach signifikant. Trotzdem ist die Gruppe ohne Iproniazid jene mit geringeren 3-T₁AM Werten, wenn auch nicht so deutlich wie im extrahierten Zelllysats.

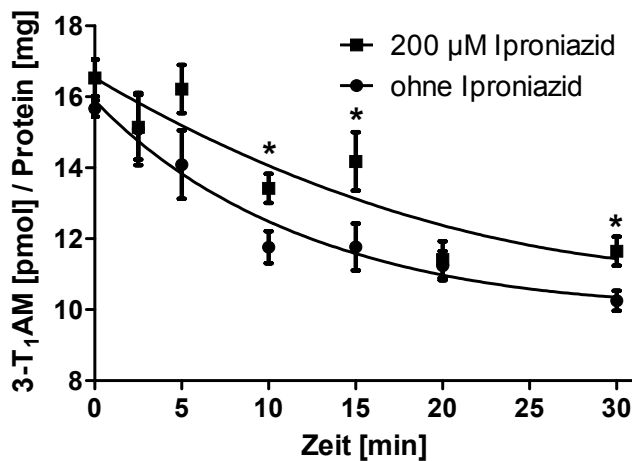


Abb. 26 3-T₁AM-LC-MS/MS Analyse von MIN6 Zellkulturüberständen

MIN6 Zellen wurden mit 100 nM 3-T₁AM für 0-30 min ± 200 µM Iproniazid als Mao-Inhibitor inkubiert. Die extrahierten Zellkulturüberstände wurden auf ihre 3-T₁AM-Konzentration mittels LC-MS/MS im Positiv-Modus analysiert. Signifikant geringere 3-T₁AM-Konzentrationen nach 30 min im Vergleich zu MIN6-Zellen die mit Iproniazid behandelt wurden. Datendarstellung als technische Triplikate dreier unabhängiger Experimente als Mittelwert ± SEM. Statistik: zweiseitiger t-Test je Zeitpunkt; * P<0,05, ns = nicht signifikant.

5.1.4 3-T₁AM abhängige Glucose stimulierte Insulinsekretion

Im MIN6 Zellmodell wurde getestet ob moderate 3-T₁AM-Konzentrationen eine Senkung der Insulinsekretion verursachen. Es wurde weiterhin untersucht ob dieser Effekt konzentrationsabhängig ist und der Metabolismus zu TA₁ eine Rolle spielt. Die gleichzeitige Exposition mit 3-T₁AM und 2,8 mM Glukose verringerte die Insulinsekretion signifikant verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. 10 und 100 nM 3-T₁AM führten zu einer vergleichbaren Senkung der Insulinsekretion. In einem weiteren Versuch wurde zusätzlich mit 200 µM Iproniazid vorinkubiert. Unter Verwendung von 100 nM 3-T₁AM konnte eine schwach signifikante Senkung der Insulinsekretion verzeichnet werden, 10 nM 3-T₁AM waren vergleichbar mit der Lösungsmittelkontrolle. Die Daten legen nahe, dass der intrazelluläre Metabolismus von 3-T₁AM zu TA₁ die Senkung der Glukose stimulierten Insulinsekretion beeinträchtigt. Wird der Umsatz zu TA₁ gehemmt, ist die Hypoinsulinämie weniger ausgeprägt bis gar nicht mehr nachweisbar.

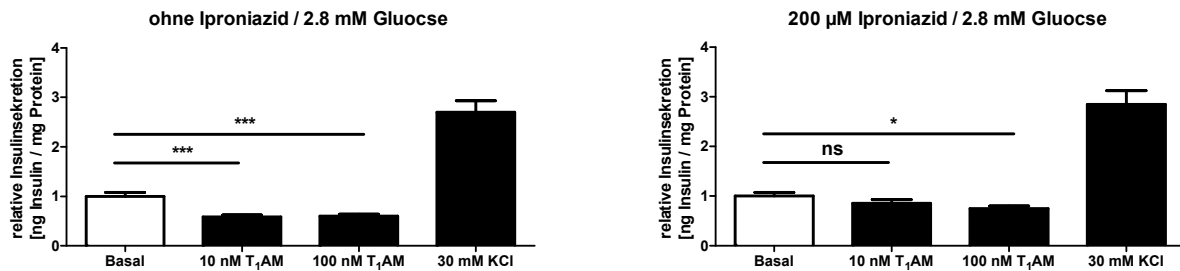


Abb. 27 3-T₁AM-abhängige Glukose stimulierte Insulinsekretion

MIN6 Zellen ± Iproniazid-Vorinkubation wurden mit 100 nM 3-T₁AM und 2,8 mM Glukose inkubiert. Anschließend wurde in Triplikaten und drei unabhängigen Versuchen die Insulinsekretion im Zellkulturüberstand gemessen und auf den zellulären Proteingehalt bezogen. Darstellung als relative Insulinsekretion bezogen auf die mit Lösungsmittel behandelte Kontrolle. 3-T₁AM und TA₁ tragen beide zu einer signifikant erniedrigten Insulinsekretion bei. Unter Mao-Inhibition ist der Zusammenhang nur noch schwach bis gar nicht mehr signifikant. Angabe als Mittelwert ± SEM. Statistik: One-way ANOVA mit Bonferroni post test; *** P<0,001, ** P<0,01 * P<0,05, ns = nicht signifikant.

5.1.5 3-T₁AM und TA₁ Wirkung an Mitochondrien und auf intrazelluläre

Substratverwertung

5.1.5 a) Versuchsaufbau - Seahorse Bioanalyzer XF96e

Für jede Zelllinie muss eine bestimmte Zellzahl pro Well vor Beginn der Messungen im Seahorse XF 96e Bioanalyzer (Seahorse Bioscience, MA, USA) austitriert werden. Entsprechend den Angaben der Herstellerfirma müssen eine Reihe von Kriterien für die optimale Messung eingerichtet werden. MIN6 Zellen wurden in aufsteigender Zelldichte im 96 Well Format ausgesät und auf deren Atmung (OCR) sowie Protonenproduktion (ECAR) in Abhängigkeit der Zellzahl untersucht. Zusätzlich wurde die Zellreaktion (OCR, ECAR) auf unterschiedliche Glukosekonzentrationen getestet. Die optimale Zellzahl (abhängig von der Zellgröße, Kulturdauer, verwendetem Medium) soll zu Messbeginn eine basale Atmung pro Well von mindestens 80-100 OCR (pMoles / min), jedoch nicht mehr als 200-250 OCR (pMoles / min) haben. Die ausgewählte Zellzahl muss im linearen Bereich der Zelltitration mit aufsteigender Zellzahl liegen und nicht im Sättigungsbereich der Zelltitrationskurve. Als Referenzpunkt für die Auswertung wird der dritte Messpunkt der Basalatmung herangezogen, da dieser am stabilsten ist. Für ECAR-Messungen gilt, dass die optimale Zellzahl bei der Basalmessung einen ECAR-Wert von ca. 20 mpH / min haben sollte. Im Fall, dass die optimalen Bedingungen für OCAR und ECAR bei verschiedenen Zellzahlen erreicht werden, so muss auf unterschiedliche Bedingungen zurückgegriffen werden, um eine optimale Messung zu gewährleisten.

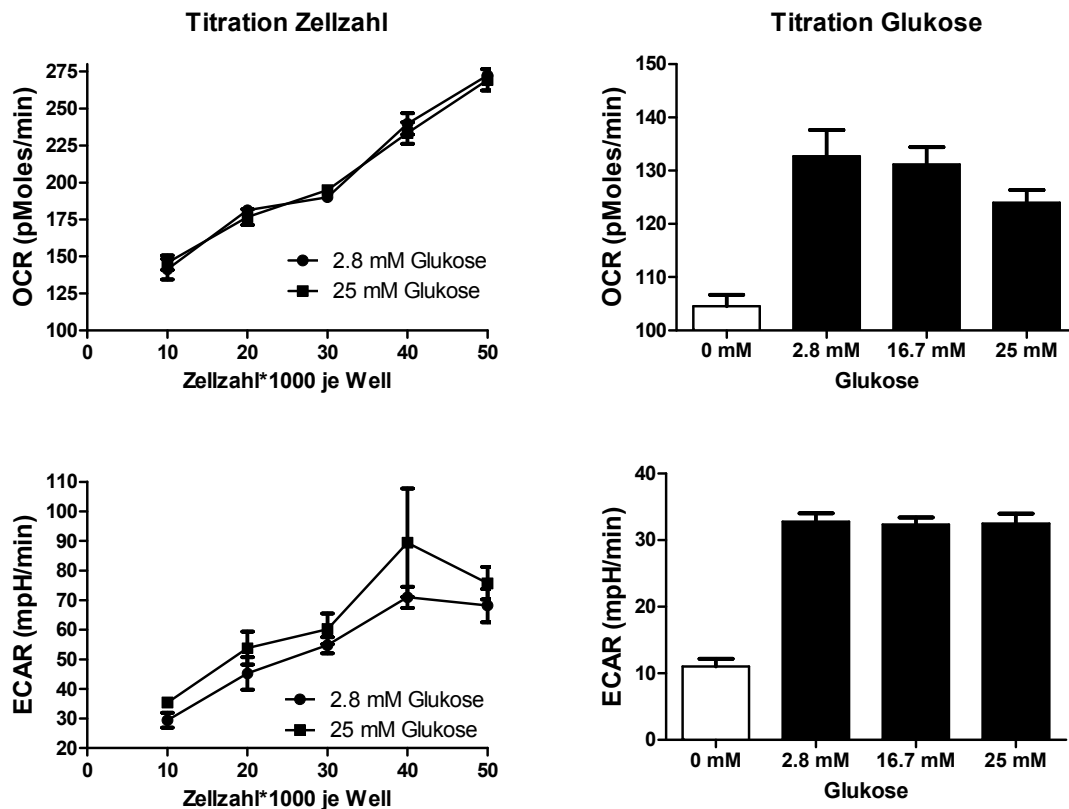


Abb. 28 Zelltitration MIN6 Zellen im Seahorse Bioanalyzer

MIN6 Zellen wurden in aufsteigender Zelldichte im 96 Well Format ausgesät und auf ihre Atmung (OCR, oben) sowie Protonenproduktion (ECAR, unten) in Abhängigkeit der Zellzahl untersucht (links). Zusätzlich wurde die Zellreaktion (OCR, ECAR) auf unterschiedliche Glukosekonzentrationen untersucht (rechts).

Es wurden auf einer 96 Well-Platte MIN6 Zellen in Zelldichten von 10.000-50.000 Zellen / Well ausgesät, über Nacht im FBS-freien Kulturmedium kultiviert und am Folgetag im Seahorse Bioanalyzer vermessen. Bei der Analyse der Sauerstoffaufnahme (OCR) zeigt sich über den gesamten Bereich ein linearer Anstieg für OCR mit steigender Zellzahl. Bereits 10.000 Zellen / Well liegen über dem minimal notwendigen Richtwert von 100 pMoles / min, wohingegen 30 - 50.000 Zellen / Well den höchsten Richtwert von 200 pMoles / min übersteigen (siehe Abb. 28 oben links). Für alle weiteren Versuche wurden 15.000 Zellen / Well ausgesät um eine basale Atmung von 150 pMoles/min zu erreichen. Bei dem Zelltitrationsversuch wurden ausserdem zwei verschiedene Glukosekonzentrationen verwendet (2,8 und 25 mM Glukose). Die Zellatmung wird durch eine höhere Glukosekonzentration nicht weiter gesteigert. Für ECAR werden weitere Untersuchungen ebenfalls mit 15.000 Zellen / Well durchgeführt, da der minimale Messwert für ECAR erreicht ist (Abb. 28 unten links). Exemplarisch wurden für 10.000 Zellen / Well drei Glukosekonzentrationen ausgetestet (zusätzlich 16,7 mM). Alle drei Glukose-Konzentrationen führen im Vergleich zu 0 mM Glukose zu einer gesteigerten Atmung (OCR) und Glykolyse (ECAR). Alle folgenden Versuche wurden mit 2,8 mM Glukose durchgeführt, da diese über die notwendige Messzeit eine sättigende

Konzentration darstellt. Eine weitere Steigerung der Glukosekonzentration führt zu keiner zusätzlichen Steigerung der Zellatmung. Im Gegenteil sinkt die Zellatmung sogar und bei den Messungen soll ein negativer Einfluss durch Glukotoxizität ausgeschlossen werden.

5.1.5 b) Vorversuch - Substanztitration

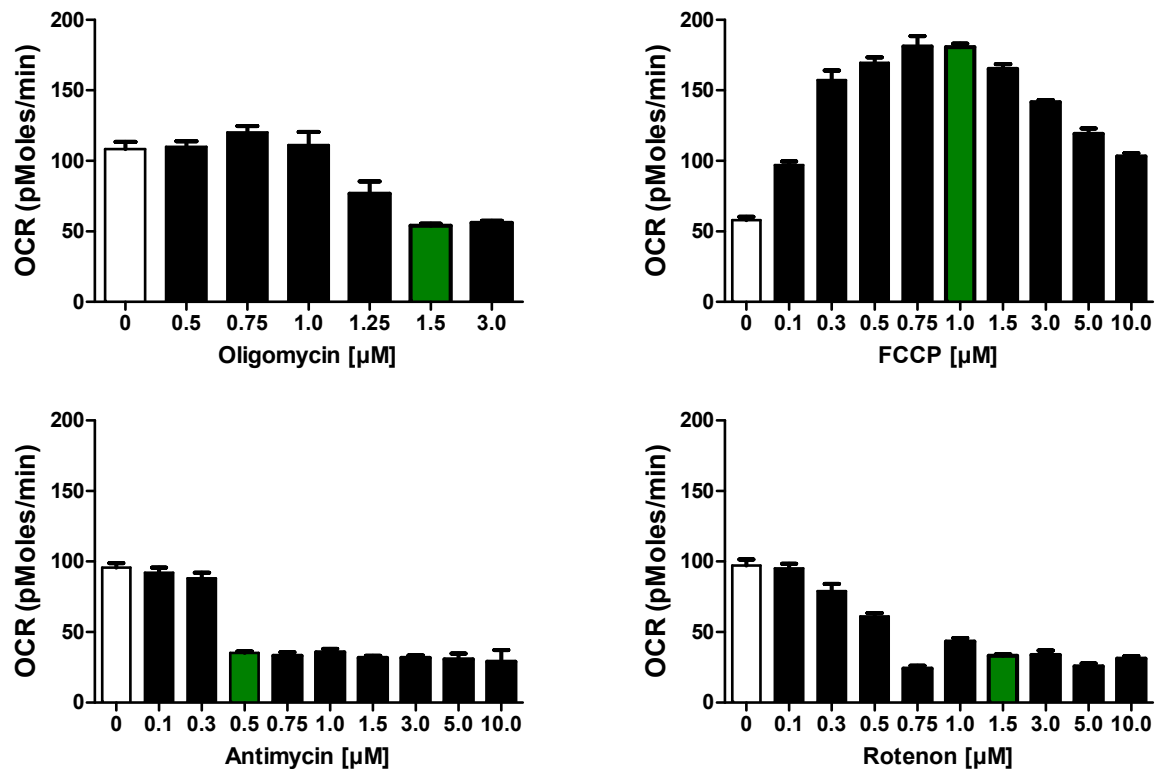


Abb. 29 Titrationskurven Inhibitoren Mitochondrien

MIN6 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen Oligomycin (oben links), FCCP (oben rechts), Antimycin (unten links) und Rotenon (unten rechts) inkubiert und auf konzentrationsabhängige Inhibition / Stimulation der mitochondrialen Atmung (OCR) untersucht. Maximale Stimulation oder Inhibition wurden grün gekennzeichnet.

Jede im Seahorse verwendete Substanz als Substrat oder Inhibitor muss mit der verwendeten Konzentration auf die zu untersuchende Zelllinie und Zellzahl abgestimmt werden. In Abbildung 29 sind die Substanztitrationen der verwendeten Inhibitoren für verschiedene mitochondriale Komplexe zur Analyse der Mitochondrienfunktion dargestellt. Von jeder Substanz wurden serielle Verdünnungsreihen hergestellt und anschließend die Änderung der zellulären Atmung im Seahorse Bioanalyzer ermittelt. Für alle weiteren Versuche wurde die Konzentration je Substanz verwendet, welche die höchste Inhibition bzw. Stimulation der Atmung zeigten (grün unterlegte Balken): Oligomycin (1,5 μM), FCCP (1,0 μM), Antimycin (0,5 μM), Rotenon (1,5 μM).

5.1.5 c) Mitochondriale Atmung

Nachdem erwiesen war, dass MIN6 Zellen 3-T₁AM aufnehmen, zu TA₁ metabolisieren und beide Metabolite eine verringerte Insulinsekretion verursachen sollte der zugrundeliegende intrazelluläre Mechanismus untersucht werden. Die Hypothese war, dass 3-T₁AM und eventuell auch TA₁ die mitochondriale ATP-Produktion in pankreatischen β -Zellen senkt, was mechanistisch zu einer verminderten Insulinsekretion führt. MIN6 Zellen wurden dazu im Seahorse Bioanalyzer nach akuter Stimulation mit TA₁ oder 3-T₁AM auf veränderte Funktionen der Mitochondrien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bereits 10 nM 3-T₁AM zu einer deutlichen (siehe Abb. 30) und ≥ 100 nM zu einer signifikanten Senkung der ATP-Produktion führten. Während die Zellen unter der Kontrollbedingung ca. 70 % (abzüglich nicht-mitochondrialer Atmung und Protonen-Leck) der Energie in ATP umsetzen sinkt die ATP-Produktion unter 3-T₁AM-Einfluss auf 10 - 20 % ab. Dies geschieht zu Gunsten eines erhöhten Protonen-Lecks, die nicht-mitochondriale Atmung bleibt unverändert. In geringem Umfang kann eine hohe Konzentration TA₁ (1 μ M) ebenfalls den ATP-Umsatz verringern. Eine Beteiligung von TA₁ an dem 3-T₁AM-Effekt kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber sehr unwahrscheinlich.

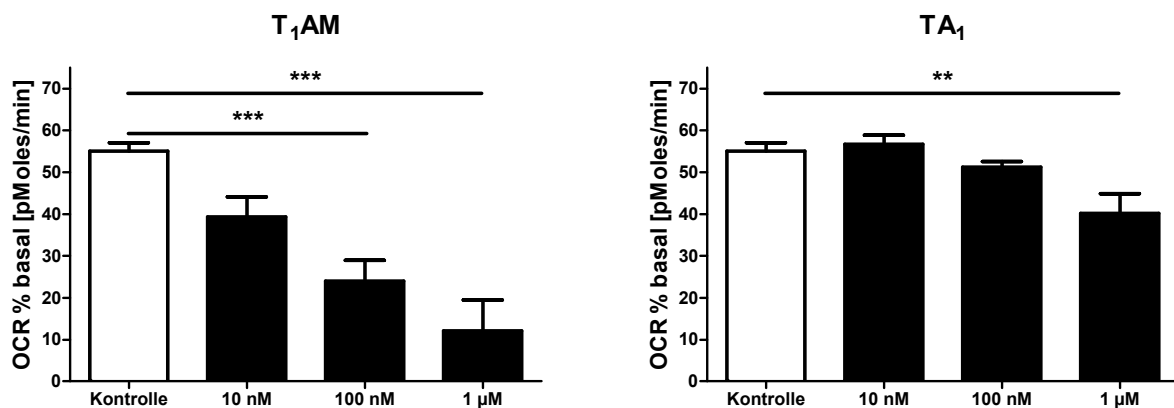


Abb. 30 3-T₁AM und TA₁ abhängige ATP-Produktion der Mitochondrien in MIN6 Zellen

MIN6 Zellen wurden akut mit 3-T₁AM oder TA₁ in aufsteigender Konzentration inkubiert und mit Inhibitoren verschiedene mitochondriale Funktionen bestimmt. Normalisierung: OCR-Werte für Oligomycin wurden auf % basale Atmung bezogen und die nicht-mitochondriale Atmung (Rotenon/Antimycin-Funktion) abgezogen. Angabe als Mittelwert \pm SEM; drei unabhängige Experimente dreier aufeinanderfolgender Passagen MIN6-Zellen; Je Inkubation in einem Experiment sechs technische Replikate. Statistik: One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test) mit Dunns Post Test; *** P<0,001, ** P<0,01.

In der gleichen Serie von Experimenten wurde untersucht, wie die maximale Atmung der MIN6 Zellen durch akute Inkubation mit 3-T₁AM oder TA₁ in aufsteigender Konzentration beeinflusst wird (siehe Abb. 31). Ausgehend von der basalen Atmung sind die Zellen, behandelt mit DMSO-Kontrolllösung, in der Lage bei Bereitstellung aller Energieäquivalente für die Mitochondrien, die Atmung noch einmal um fast 100 % zu steigern. Mit 10 nM 3-T₁AM ist die maximale Atmung über basal schon deutlich geringer (bei ca. 60 %). Bei steigenden Konzentrationen 3-T₁AM (100 nM – 1 μ M)

sinkt die Reserveatmung nach maximaler Stimulation auf ein Minimum von 20 %, was für beide untersuchten Konzentrationen signifikant geringer ist im Vergleich zur Kontrolle. Im gleichen Versuchsansatz wurden MIN6-Zellen auch mit TA₁ direkt behandelt und die Wirkung dieser Substanz in steigender Konzentration auf die gleiche Kontrollgruppe bezogen. Es zeigte sich, dass steigende Konzentrationen TA₁ eine Senkung der maximalen Atmung über basal auslösten, jedoch ist die Änderung nicht signifikant. Auf Grund dessen kann keine eindeutige Aussage dazu getroffen werden, ob TA₁ einen Einfluss hat.

3-T₁AM ist nach den Untersuchungen im Seahorse XF96 Seahorse Bioanalyzer in MIN6 Zellen für eine gesenkte ATP-Produktion und eine verringerte Reservekapazität nach akuter Applikation verantwortlich. Dieser signifikante Zusammenhang besteht auch bei der Verwendung von 100 nM 3-T₁AM. Demzufolge kann die Inhibition an den Mitochondrien Ursache für die verringerte Insulinsekretion sein. Wenn TA₁ in diesem Zusammenhang eine Funktion hat, dann ist sie untergeordnet. Um die ATP-Produktion signifikant durch TA₁ zu beeinflussen müssen 1 µM eingesetzt werden, was einem Vielfachen der intrazellulären Konversionsrate aus 3-T₁AM entspricht. Damit ist die Wirkung von TA₁ pharmakologisch, wohingegen für die Applikation von 100 nM 3-T₁AM eine physiologische oder supraphysiologische Bedeutung nicht ausgeschlossen werden kann.

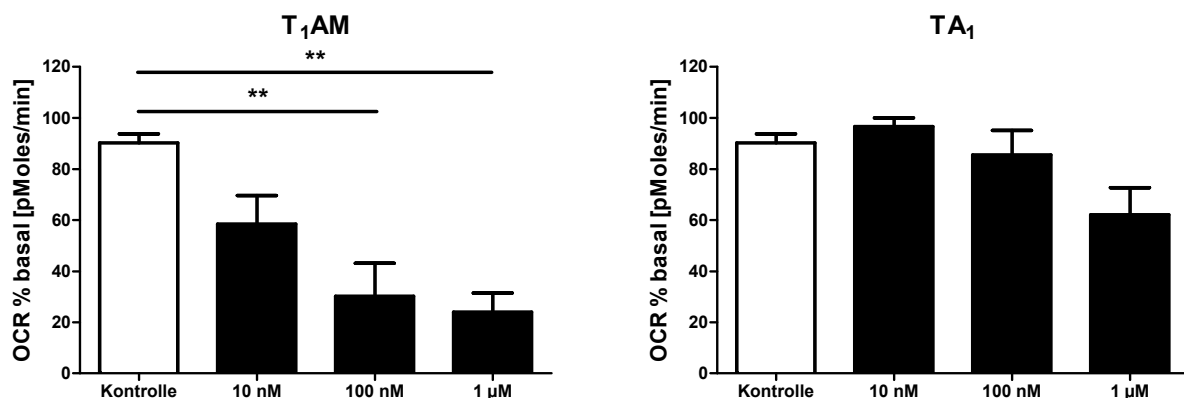


Abb. 31 3-T₁AM und TA₁ abhängige maximale Atmung über basal der Mitochondrien in MIN6 Zellen

Intakte MIN6 Zellen wurden akut mit 3-T₁AM oder TA₁ in aufsteigender Konzentration inkubiert. Mit mitochondrialen Inhibitoren wurden verschiedene Mitochondrien-Funktionen bestimmt. Normalisierung: OCR-Werte für FCCP wurden auf % basale Atmung bezogen und die nicht-mitochondriale Atmung (Rotenon/Antimycin-Funktion) abgezogen. Angabe als Mittelwert ± SEM; drei unabhängige Experimente dreier aufeinanderfolgender Passagen MIN6-Zellen; Je Inkubation in einem Experiment sechs technische Replikate. Statistik: One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test) mit Dunns Post Test; ** P<0,01.

5.2 TH-stimulierter zellulärer Energiestoffwechsel von Hepatozyten

5.2.1 Versuchsaufbau - Seahorse Bioanalyzer XF24

Aus in der Literatur beschriebenen Versuchen war bereits bekannt, dass 3,5-T₂ eine direkte Bindungsstelle am Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette besitzt. Die Stimulation des Komplexes IV wurde an isolierten Mitochondrien, Leberhomogenaten oder permeabilisierten Hepatozyten bereits nachgewiesen (siehe 1.5.1). Die Effekte traten innerhalb weniger Minuten ein und waren unabhängig von der mitochondrialen Proteinmenge. Im Rahmen dieser Arbeit sollte im Seahorse Bioanalyzer untersucht werden, ob dieser Mechanismus bestätigt werden kann, wenn ein intaktes hepatozelluläres Zellsystem genutzt wird. Es ist nicht bekannt wie 3,5-T₂ durch die einzelnen mitochondrialen Membranen gelangt um die Bindungsstelle an Komplex IV zu erreichen. In dem hier verwendeten Versuchsansatz bildet die Plasmamembran eine unmittelbare weitere Barriere. Ein Membrantransporter für 3,5-T₂ war zu dem Zeitpunkt der Untersuchungen nicht bekannt.

Tabelle 16 Übersicht der verwendeten Versuchsbedingungen im Seahorse XF24 Bioanalyzer

zur Analyse T₃ / 3,5-T₂ - stimulierten mitochondrialen Atmung in HepG2 Zellen.

Injektion	Versuchsmaterial	Versuchsbedingung	Funktion
1)	HepG2 Zellen	40.000 Zellen pro Well	
2) Port A	Ascorbat	32 µM	Substrat Komplex IV
3) Port B	3,5-T ₂	10 pM – 100 nM	
4) Port B	T ₃	100 nM – 1 µM	
5) Port C	2,4-DNP	33 µM	Entkoppler
6) Port D	NaN ₃	1 mM	Inhibitor Elektronentransport
7) Port D	Rotenon	1 µM	Inhibitor Elektronentransport

Die Titration der verwendeten Substanzen (siehe Tabelle 16) wurde ähnlich wie unter 5.1.5 b) für MIN6 Zellen beschrieben durchgeführt. Dieser Versuchsteil wurden in einem 24 Well Seahorse XF Flux Bioanalyzer der alten Generation durchgeführt. Wegen dem begrenzten Well Format wurden die Substanzen während der Titration sukzessiv über Port A-D in aufsteigender Konzentration zugegeben bis eine maximale Inhibition oder Stimulation erreicht war (siehe Tabelle 16).

5.2.2 Einfluss des 3,5-T₂s auf die mitochondriale Atmung und den zellulären Protonenfluss

Da die Zielstruktur für 3,5-T₂ bereits beschrieben war, wurden die Experimente so konzipiert, dass der Komplex IV direkt durch die verwendeten Substanzen stimuliert wurde (siehe Abb. 32).

Als Substrat wurde Ascorbat eingesetzt, das die Arbeit des Komplexes IV stimulieren sollte. Danach wurde 2,4-DNP als entkoppelndes Reagenz zugegeben, um beurteilen zu können, ob die maximale Atmung oder die Reservekapazität beeinflusst werden. Abschliessend wurde Komplex IV direkt durch die Zugabe von NaN_3 gehemmt, was die mitochondriale Atmung zum Erliegen brachte. Alternativ wurde Rotenon als Komplex I Inhibitor verwendet.

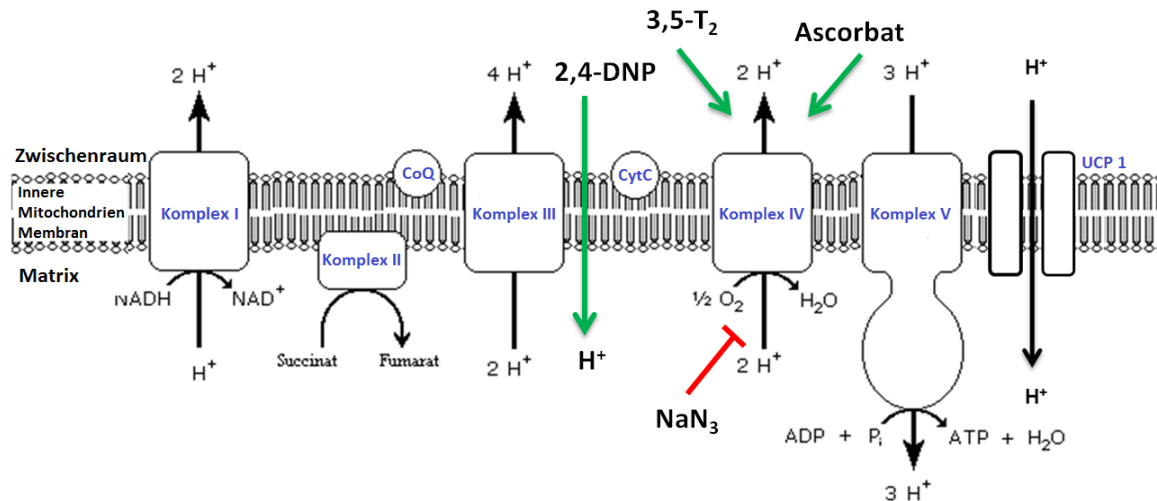


Abb. 32 Innere Mitochondrienmembran mit Elektronentransportkette

Zielstruktur des 3,5- T_2 s ist die CytcOx (Komplex IV). Ascorbat als Substrat für Komplex IV, Entkoppler (2,4-DNP) und der Inhibitor des Elektronentransports (NaN_3) wurden nacheinander zu HepG2 Zellen zugegeben um den 3,5- T_2 abhängigen Stoffwechsel zu analysieren.

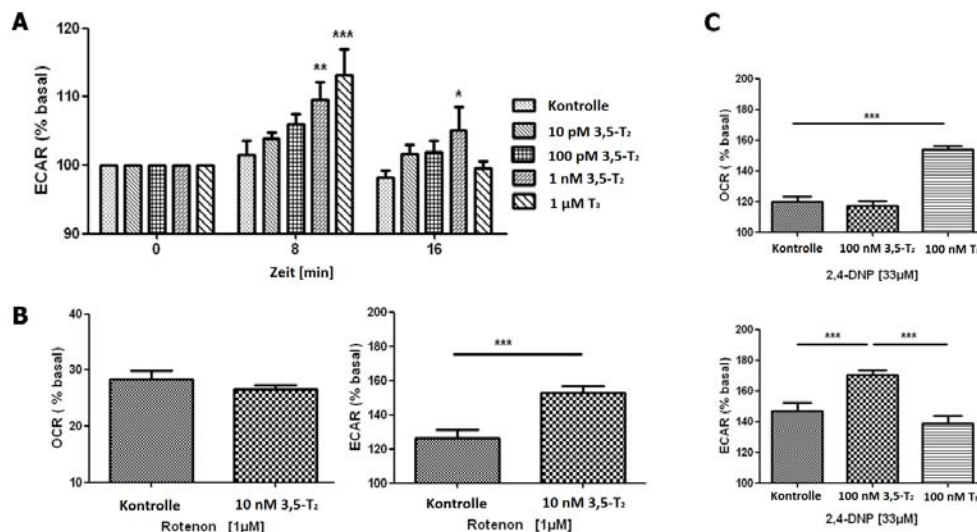


Abb. 33 Extrazelluläre Protonen-Akkumulation durch akute 3,5- T_2 und T_3 Stimulation

Konzentrations- und zeitabhängiger Anstieg in ECAR nach 3,5- T_2 und T_3 Zugabe (A). 3,5- T_2 -Effekte auf ECAR sind weiterhin messbar, wenn Rotenon zur Blockierung des Elektronentransports zugegeben wird (B). 10 nM 3,5- T_2 , aber nicht 10 nM T_3 rufen die Ansäuerung des extrazellulären Mediums hervor (C) n=2 Experimente, 3-4 Replikate; Mittelwert \pm SEM; Statistik: 1way ANOVA *** $P \leq 0,001$ ** $P \leq 0,01$ * $P \leq 0,05$

Nach akuter Stimulation mit geringen 3,5-T₂s Konzentrationen (10 pM bis 1 nM) war eine geringe (ca. 3 %), nicht signifikante, jedoch konzentrationsabhängige Steigerung der mitochondrialen Atmung (OCR) messbar (Abb. 34 A). Gleichzeitig kam es zu einer reversiblen zellulären Abgabe von Protonen in das Zellkultur-Medium. Diese war konzentrationsabhängig und wurden durch 3,5-T₂ und T₃ stimuliert (Abb. 33 A). Mit 100 nM T₃ wurde ein deutlicher Anstieg der mitochondrialen Reservekapazität, sowie der maximalen Atmung nach Stimulation mit 2,4-DNP verzeichnet (siehe Abb. 34 B). Die gleiche Konzentration 3,5-T₂ hatte dagegen keinen Effekt auf OCR verglichen mit zur Lösungsmittelkontrolle. Betrachtete man dagegen wieder den nach extrazellulär gerichteten Protonenfluss unter Einfluss des Entkopplers, so zeigte sich, dass 100 nM 3,5-T₂ auch unter dieser Bedingung die Protonen-Anreicherung im Medium auslösten (siehe Abb. 33 C). Dagegen hatte die gleiche Konzentration T₃ keinen Einfluss auf den Protonenfluss. Der vermehrte Protonenfluss war ausserdem unter Hemmung der mitochondrialen Atmung messbar, wenn 10 nM 3,5-T₂ und danach Rotenon zu den Zellen gegeben wurde.

Im gewählten Zellmodell HepG2 konnte nach Zugabe diverser Konzentrationen 3,5-T₂ die mitochondriale Atmung nicht stimuliert werden. Dieser Effekt kann allerdings mit pharmakologischen Konzentrationen T₃ hervor gerufen werden.

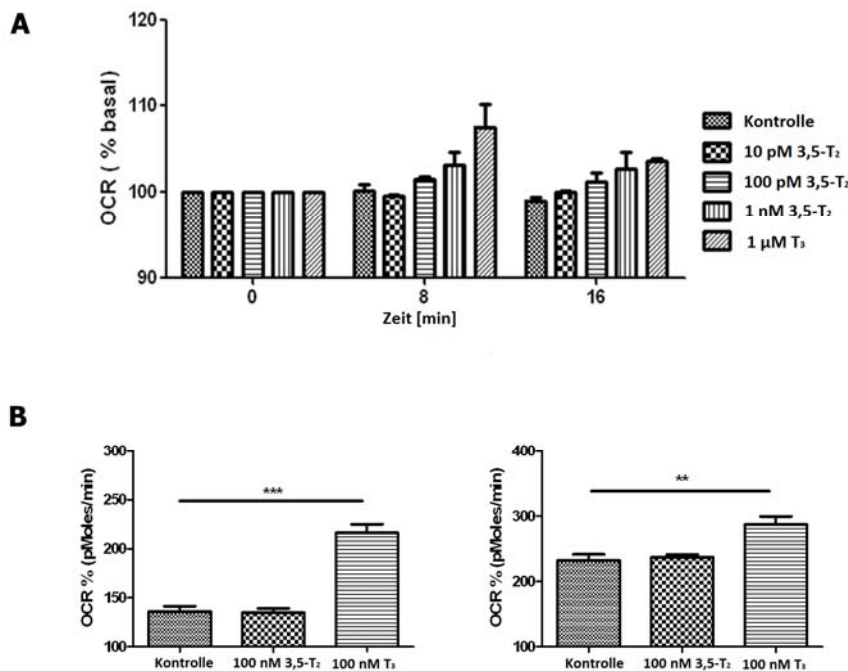


Abb. 34 Zelluläre Sauerstoffaufnahme nach akuter 3,5-T₂ und T₃-Stimulation

Zeit- und konzentrationsabhängiger OCR-Anstieg nach 3,5-T₂ Stimulation (A). 100 nM T₃, aber nicht 100 nM 3,5-T₂ steigert die Sauerstoffaufnahme nach Entkopplung der Atmungskette durch 2,4-DNP. Links: Reservekapazität der Mitochondrien; Rechts: Maximale Atmung der Mitochondrien (B) n=2 Experimente, 3-4 Replikate, Mittelwert ± SEM; Statistik: 1way ANOVA ***P≤0,001 **P≤0,01.

5.2.3 Zelluläre 3,5-T₂-Aufnahme

Da 3,5-T₂ keine Stimulation der mitochondrialen Atmung zeigte, wurde vermutet, dass 3,5-T₂ in dieses Zellmodell nicht aufgenommen wird. Da kein Transporter für 3,5-T₂ beschrieben ist, wurde eine weitreichende vergleichende Analyse der bekannten und potenziellen TH-Transporter in Maus-Leber, primären Hepatozyten der Maus, HepG2 Zellen sowie in einem weiteren hepatozellulären Modell (HUH-7) durchgeführt (siehe Abb. 35). Die Zelllinien HepG2 und HUH-7 haben im Vergleich zu Leber und primären Hepatozyten kein MCT8, LAT2 und kaum MCT10. HepG2 Zellen exprimieren Lat1. Das Transporter-Spektrum in Leber und primären isolierten Hepatozyten ist viel größer. Dagegen ist in Zelllinien lediglich Lat1 der vorherrschende Transporter. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Aufnahmekapazität hepatozellulärer Zelllinien begrenzt ist und besser differenzierte Zellmodelle für die Untersuchung der 3,5-T₂- und T₃-Wirkung an den Mitochondrien genutzt werden sollten.

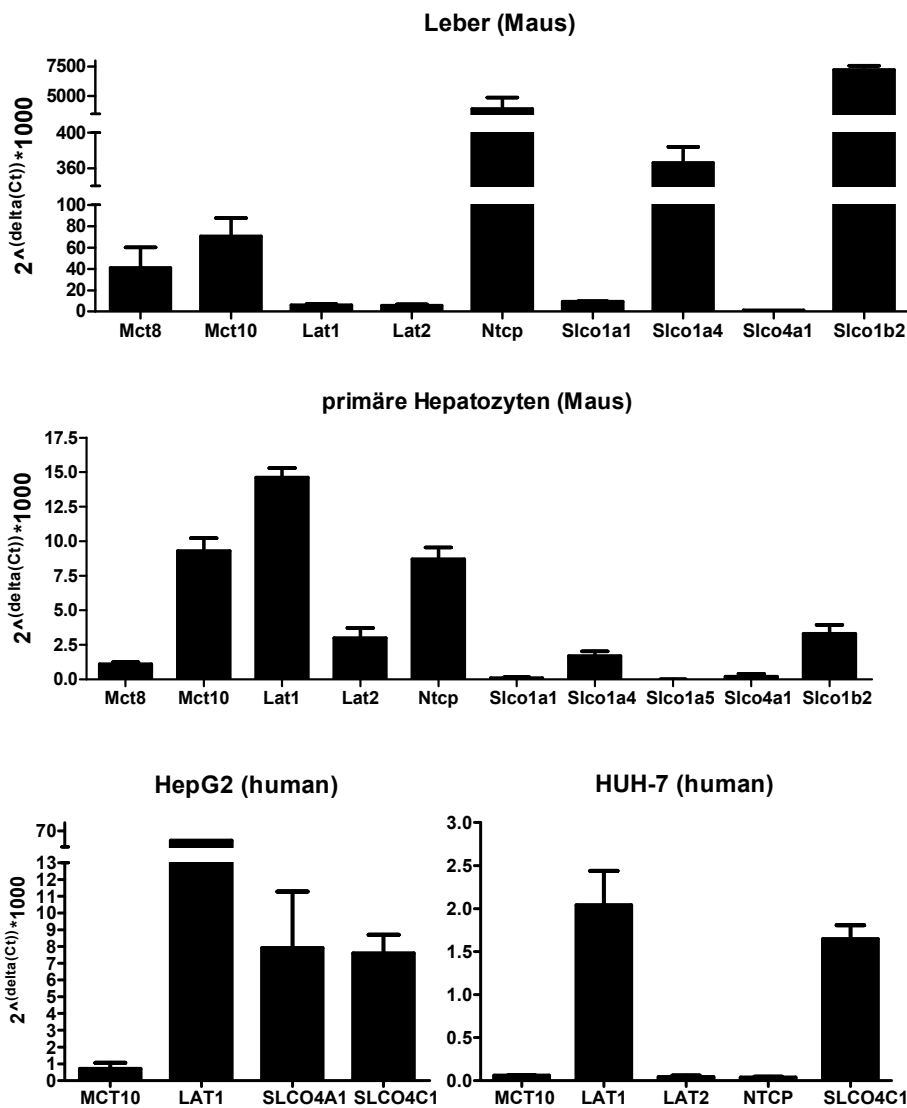


Abb. 35 Real-time PCR Analyse der Transporter-Expression in Maus-Leber, primären Hepatozyten der Maus sowie zwei humanen Zelllinien HepG2 und HUH-7

Es wurden je Zelllinie drei aufeinanderfolgende Passagen und von den primären Hepatozyten drei Isolate in Triplikaten untersucht, sowie die Lebern sechs verschiedener Mäuse.

5.3 Etablierung einer mAb-spezifischen Messmethode für 3,5-T₂ im humanen Serum

5.3.1 Produktion von mAb spezifisch für 3,5-T₂

3,5-T₂ ist ein körpereigener Hormonmetabolit der keine Speziesunterschiede aufweist. Um eine Immunreaktion im Tier auszulösen wurde 3,5-T₂ an BSA als Trägerprotein gekoppelt. Zur Herstellung von mAb, die 3,5-T₂ erkennen, wurden Balb/c Mäuse mit BSA gekoppeltem 3,5-T₂ immunisiert (siehe Abb. 16). Vier Wochen nach der zweiten Antigen-Injektion wurden die polyklonalen Antikörper-Titer im Mausserum bestimmt. Der Screening-Assay zeigte, dass zwei von drei Mäusen zu diesem Zeitpunkt mit hoher Antikörper-Produktion auf die Antigen-Immunisierung reagierten (Maus 1 und 2, siehe Abb. 36). Jedoch war ein Grossteil der polyklonalen Antikörper-Reaktivität gegen BSA als Trägerprotein und nicht 3,5-T₂ selbst gerichtet. Lediglich die Immunreaktivität in Maus 1 gegen 3,5-T₂-BSA war erhöht im Vergleich zu der BSA-Reaktivität selbst. Dies wies darauf hin, dass in dieser Maus tatsächlich 3,5-T₂-spezifische Antikörper produziert wurden. Alle drei Mäuse wurden ein drittes Mal mit dem Antigen immunisiert (siehe Abb. 16). Beim erneuten Test auf polyklonale Antikörper im Mausserum zeigte sich, dass nur Maus eins auf die erneute Immunisierung mit einer Verdopplung der Reaktivität gegen 3,5-T₂-BSA entsprechend reagierte, worin ebenso eine Erhöhung der 3,5-T₂-spezifischen Antikörper-Antwort eingeschlossen ist.

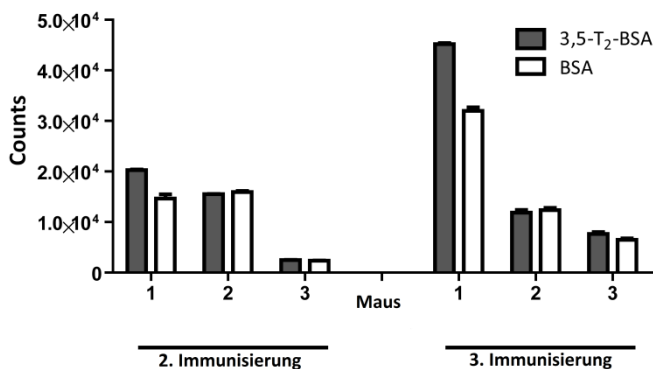


Abb. 36 Serum Titer Test

3,5-T₂-BSA- bzw. BSA-Reaktivität der polyklonalen Antikörper im Serum immunisierter Mäuse (Mittelwert ± SEM).

5.3.2 Vorscreening

Durch die Fusionierung der isolierten Milz-Lymphozyten aus Maus eins mit murinen Myelomazellen (PAI) wurden immortale Hybridomazellen hergestellt, entsprechend der Hybridoma-Technologie von Köhler und Milstein (130), und in 10 96-Well-Platten ausgesetzt.

Annähernd 50 von 960 Wells mit Antikörper-produzierenden Hybridoma erkannten das komplette Antigen 3,5-T₂-BSA (siehe Abb. 37). Jedoch reagierten 41 davon nicht spezifisch gegen 3,5-T₂ selbst, sondern erkannten BSA. Lediglich Überstände von sieben Wells mit Hybridoma hatten keinerlei Reaktivität mit BSA. Vier davon (2D2, 4F8, 9D3, 9G11) zeigten zusätzlich die best-mögliche

Kompetition mit unmarkiertem 3,5-T₂ im Screening Assay. Für diese Hybridoma wurde durch limitierende Verdünnung sichergestellt, dass es sich um lediglich einen uniformen Klon handelt der im weiteren Verlauf expandiert wurde um eine größere Menge mAb für die Aufreinigung zu gewinnen.

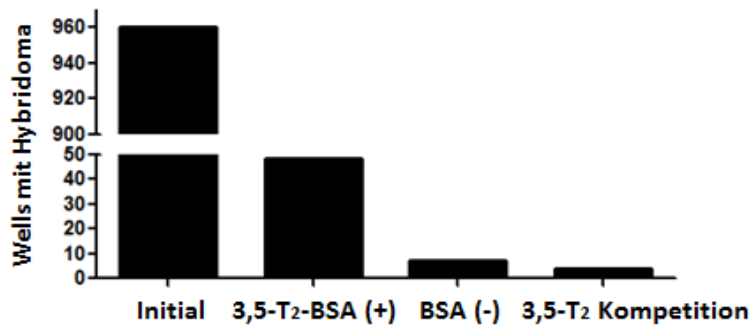


Abb. 37 Schematische Darstellung des Hybridoma-Screenings.

Die produzierten Antikörper der vier Klone wurden den folgenden Ig-Subklassen zugeordnet: 2D2 (IgG_{2b}), 4F8 und 9D3 (IgG₁), 9G11 (IgM). Für all diese Klone wurden die produzierten mAb auf Kreuzreaktivitäten mit wichtigen TH (T₃, T₄, T₂ sowie relevantes TAM und TA) untersucht (siehe Tabelle 17). Alle mAb hatten vergleichbare Kreuzreaktivität mit T₃ (< 0,1 %), 9G11 und 4F8 zeigten 10-fach niedrigere Kreuzreaktivitäten mit T₄ im Vergleich zu den beiden anderen mAb 2D2 und 9D3. 2D2 und 9D3 zeigten ausserdem erhöhte Kreuzreaktivität gegen 3,5-T₂AM (ca. 2 % und 5 %) im Gegensatz zu 4F8 (< 1 %). Aufgrund dieser Daten wurde 4F8 als präferenzierter mAb für die Etablierung des Chemilumineszenz-Immunoassays (CLIA) ausgewählt. Trotzdem wurden die mAb 2D2, 4F8 und 9D3 weiter kloniert und expandiert, falls auf diese zurückgegriffen werden musste. Der Hybridoma Klon 9G11 stellte sein Wachstum während der Expansion durch limitierende Verdünnung ein und konnte trotz der hohen Sensitivität der produzierten Antikörper und geringen Kreuzreaktivitäten nicht weiter verwendet werden. In ersten Vorversuchen eine Standardreihe mit hoher Sensitivität zu erstellen zeigte sich 9D3 als wenig geeignet, wohingegen 2D2 und 4F8 vergleichbar gut waren, 2D2 aufgrund seiner höheren Kreuzreaktivität im Vorscreening (Tabelle 17) dann aber vernachlässigt wurde.

In dem Vorscreening wurde der mAb 4F8 als 3,5-T₂ spezifischer und Kreuzreaktivitätsarmer mAb identifiziert.

Tabelle 17 Kreuzreaktivität

Unspezifische Immunoassayreaktion ausgewählter mAb mit relevanten Thyroninen, Thyronaminen und Thyroessigsäure.

NA = nicht analysiert

Hybridoma-Zellklone	Kreuzreaktivität (%)			
	2D2	9G11	4F8	9D3
Iodothyronin				
3,5-T₂	100	100	100	100
3,3'-T₂	< 0,1	NA	< 0,1	NA
3',5'-T₂	< 0,1	NA	< 0,1	NA
T₃	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
T₄	< 0,1	< 0,01	< 0,01	< 0,1
Iodothyronamin				
3,5-T₂AM	1,83	NA	<1,0	5,0
Iodothyroessigsäure				
e				
Diac	1,2	NA	2,1	NA

5.3.3 CLIA Optimierung

Der mAb 4F8 wurde für die Etablierung des CLIA aufgrund seiner hohen Analytspezifität und sehr geringen Kreuzreaktivität mit wichtigen TH und 3,5-T₂AM ausgewählt.

Während der Über-Nacht-Inkubation wurde eine limitierte Menge des mAb 4F8 mit dem 3,5-T₂ im Serum vorinkubiert um eine möglichst grosse Menge des Analyten an den mAb zu binden (siehe Abb. 38). HRP-konjugiertes 3,5-T₂ wurde für eine zusätzliche Stunde als Detektionssystem zugegeben, sodass frei Bindungsstellen am mAb damit besetzt werden konnten.

3,5-T₂ Werte im humanen Serum werden anhand der Chemilumineszenz-Signale einer Standard-Kurve quantifiziert. Alle Assaykomponenten und Inkubations-Konditionen wurden zugunsten der Assay-Sensitivität und -Spezifität optimiert. Eine Mischung aus PBST und LCB wird als Assaypuffer verwendet um Matrix-Effekte zu reduzieren. Ein kommerziell verfügbares 3,5-T₂, T₄ und T₃-defizientes humanes Serum wird als Matrix zur Herstellung der Standardreihe verwendet (99). Es wurde getestet, ob diese Matrix vergleichbar zu 7% BSA-PBST als artifizielle Serummatrix für die Verdünnung der 3,5-T₂ Standards verwendet werden kann (Abb. 39 A). Die Standardreihe, angesetzt in defizientem Serum zeigte im Vergleich zu 7% BSA-PBST als Matrix lediglich einen geringen Drift nach links. Daraus kann geschlossen werden, dass BSA oder das defiziente Serum vergleichbar gut als Matrix verwendet werden können, wobei die Quantifizierung von 3,5-T₂ selbst nicht negativ

beeinflusst wird. Allerdings werden Linearität und Wiederfindungsraten des 3,5-T₂s im CLIA deutlich verbessert, wenn das defiziente humane Serum als Matrix verwendet wird (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde der kommerzielle Serumpool standardmäßig als Matrix für die Standardreihe verwendet.

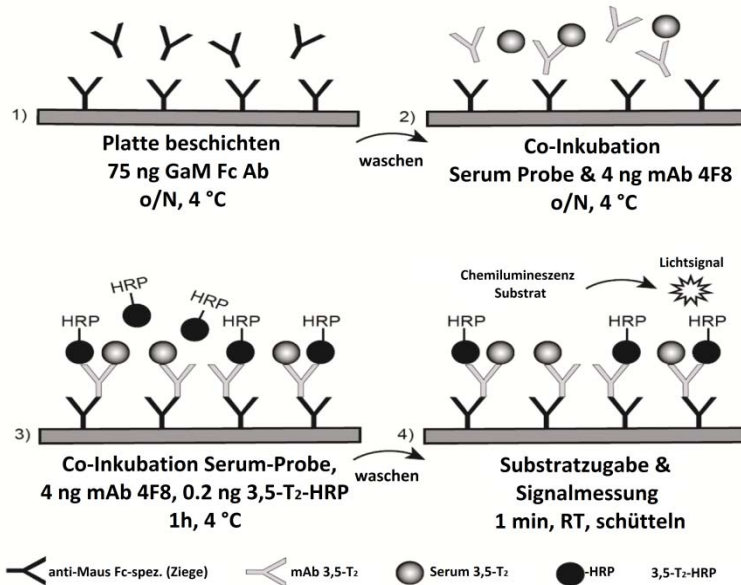


Abb. 38 Prinzip des etablierten CLIA zur Detektion von 3,5-T₂ im humanen Serum

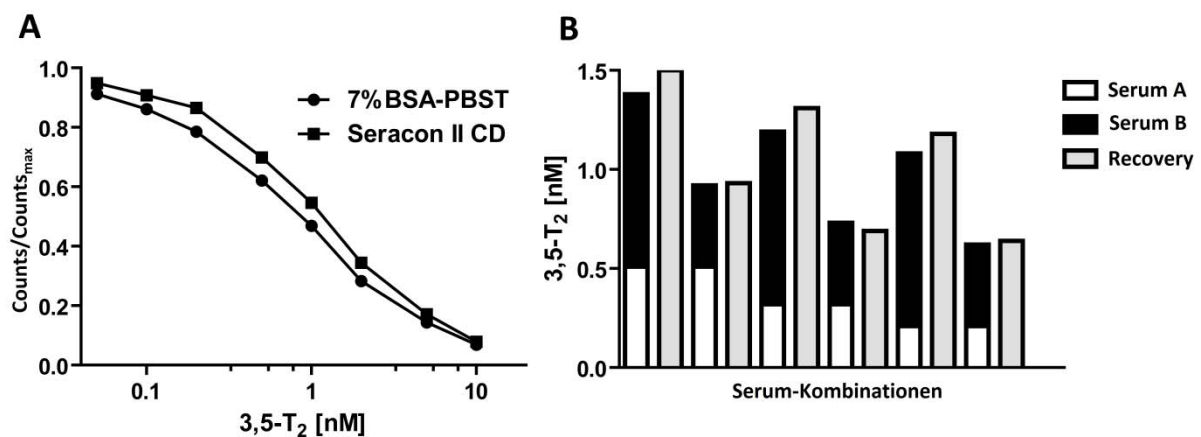


Abb. 39 Immunoassay-Validierung

Serielle Verdünnung des nicht-markierten 3,5-T₂ in TH-defizientem Serum (Seracon CD II) oder 7% BSA-PBST (A). Volumengleiche Kombinationen fünf verschiedener Seren (zweifarbige Balken) und die zugehörige Wiederfindungsrate (nM 3,5-T₂) der gemischten Seren (B).

Tabelle 18 Zusammenfassung relativer CLIA-Kreuzreaktivitäten (%). Verwendet wurden TH und deren Metabolite, die strukturelle Ähnlichkeit zu 3,5-T₂ aufweisen (TAM, TA). In der Tabelle sind sowohl die höchst getesteten Konzentrationen aller Substanzen, sowie deren physiologische Konzentration (soweit bekannt) im humanen Serum verzeichnet. NA = nicht analysiert, NQ = nicht quantifiziert, ND = nicht detektiert

	Getestete Konzentration (nM)	Kreuzreaktivität (%)	Physiologische Konzentration (nM)	Referenz
Thyronin				
T ₄	250	<0,2	110	(134)
T ₃	100	2,3	2,1	(134)
rT ₃	100	<0,2	0,62	(134)
3,5-T ₂	-	100	0,055	(134)
			0,24	(135, 136)
3,3'-T ₂	100	<0,2	0,058	(134)
3',5'-T ₂	100	<0,2	0,085	(134)
3-T ₁	100	<0,2	0,057	(134)
3'-T ₁	100	<0,5	0,059	(134)
T ₀	100	<0,2	NQ	(137)
Thyronamin				
T ₄ AM	100	<0,2	ND	
T ₃ AM	100	<0,2	ND	
rT ₃ AM	100	<0,2	ND	
3,5-T ₂ AM	100	3,5	ND	
3,3'-T ₂ AM	NA	-	-	
3',5'-T ₂ AM	NA	-	-	
3-3-T1AM	250	<0,2	60	(103)
3'-3-T1AM	NA	-	-	
T ₀ AM	100	<0,2	NQ	
Thyroessigsäure				
TA ₄ / Tetrac	100	<0,5	7,2	(134)
TA ₃ / Triac	100	<0,2	2,8	(134)
3,3'-TA ₂	NA	-	ND	
3,5-TA ₂	100	10,9	ND	
3-TA ₁	100	<0,2	< 0,1	(40)
TA ₀	NA	-	ND	

5.3.4 Spezifität des CLIA

Der mAb 4F8 (IgG₁)-basierte CLIA wurde hinsichtlich möglicher Assay-Interferenzen mit anderen TH, TAMs oder TA charakterisiert (siehe Tabelle 18). Die Kreuzreaktivität im Assay war geringer als 0,2 % für die meisten TH (T₀, 3-T₁, 3',5'-T₂, 3,3'-T₂, rT₃, T₄), TAM (T₄AM, T₃AM, rT₃AM, 3-T₁AM, T₀AM) und TA (TA₃, 3-TA₁). Nur T₃ zeigte eine 2,3 %ige Kreuzreaktivität. Allerdings wurde eine T₃-Konzentration getestet (100 nM), die 50-fach höher als die physiologische Serumkonzentration des T₃s ist (2,1 nM). Die Kreuzreaktivität des 3'-T₁s und TA₄s war geringer als 0,5 %. Es wird geschlussfolgert, dass die detektierten relativen Kreuzreaktivitäten die Detektion von 3,5-T₂ im Serum nicht beeinflussen. Wie erwartet, hat der mAb 4F8 nachweisbare Kreuzreaktivitäten mit 3,5-T₂AM (3,5 %) und 3,5-TA₂ (10,9 %). Jedoch kann keine der beiden Substanzen mit analytischen Methoden im humanen Serum oder im Gewebe nachgewiesen werden (siehe Tabelle 18 oder Review (103)). Zusammenfassend zeigen die Daten eine hohe Spezifität des mAbs 4F8 gegenüber 3,5-T₂.

5.3.5 Präzision und Zuverlässigkeit des Immunoassays

Die Linearität des Immunoassays wurde durch serielle Verdünnungen individueller humaner Seren in 3,5-T₂-defizientem Serum überprüft. Die relativen Wiederfindungsraten wurden durch direkten Vergleich mit den 3,5-T₂-Werten in den unverdünnten Seren berechnet. Bei einer 1:2 Verdünnung lag die Wiederfindungsrate bei $92,3 \pm 16,0$ % (n=6 Seren). Eine 1:4 Verdünnung erbrachte vergleichbare Ergebnisse ($95,4 \pm 11,6$ %; n=6 Seren), was insgesamt eine gute Vergleichbarkeit zwischen erwarteten und gemessenen 3,5-T₂ Konzentrationen nachweist. Die Genauigkeit des CLIA wurde durch die Zugabe von exogenem 3,5-T₂ in steigenden Konzentrationen zu den humanen Seren untersucht, wobei die gemessenen 3,5-T₂ Konzentrationen den gesamten linearen Bereich der Standardkurve abdeckten. Die Ergebnisse zeigten eine sehr gute Übereinstimmung erwarteter und tatsächlich gemessener 3,5-T₂ Konzentrationen nach Zugabe von 0,2 nM ($93,7 \pm 7,6$ %) und 0,5 nM ($96,8 \pm 11,0$ %). Ebenso war die relative Wiederfindungsrate nach Zugabe von 1,0 nM ($78,0 \pm 9,6$ %) oder 2,0 nM 3,5-T₂ ($85,8 \pm 8,3$ %) gut. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate des 3,5-T₂s im Bereich 0,2 bis 2,0 nM war $88,5 \pm 8,5$ %. Für diese Messungen wurden fünf verschiedene humane Seren verwendet, deren endogene 3,5-T₂ Konzentrationen im niedrigen, mittleren und hohen Bereich lagen, um sicher zu stellen, dass ein großer Bereich individueller Variationen abgedeckt werden kann. Um die Zuverlässigkeit des CLIA weiter zu charakterisieren wurden Volumen-gleiche Mischungen zweier verschiedener Seren mit jeweils drei weiteren Seren hergestellt (Abb. 39 B). Die theoretischen Serumkonzentrationen der Einzelseren wurden mit den Serum-Mischungen verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine gute Übereinstimmung erwarteter und gemessener 3,5-T₂ Konzentrationen mit einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von $104,7 \pm 6,1$ %.

Die Variation innerhalb eines Assays wurde durch die wiederholte Messung (n=10-12) des 3,5-T₂s in individuellen humanen Seren (n=4) bestimmt, wobei die Seren den Konzentrationsbereich 0,5 - 1,5 nM abdeckten. Die Mittelwerte der gemessenen 3,5-T₂ Konzentrationen waren 0,6, 0,8, 1,1 und 1,4 nM (siehe Tabelle 19). Der Variationskoeffizient für die einzelnen Messwerte war jeweils 9,0 %, 8,9 %, 5,0 % und 4,1 %. Die Messvariation zwischen verschiedenen Assays wurde durch die wiederholte Messung (n=15) der gleichen drei Seren an verschiedenen Tagen bzw. auf verschiedenen Assayplatten bestimmt. Die Mittelwerte der gemessenen 3,5-T₂ Konzentrationen waren 0,5, 1,0 und 1,5 nM (siehe Tabelle 19). Der Variationskoeffizient betrug jeweils 12,9 %, 6,5 %, 5,6 %. Das untere Detektionslimit von 0,2 nM im Assay wurde berechnet aus dem Mittelwert (0,07 nM) plus drei Standardabweichungen (0,04 nM) bezogen auf die theoretische Quantifizierung des 3,5-T₂s in analytfreier Serummatrix (n=24 Einzelmessungen). Der Arbeitsbereich des Assays ist somit 0,2 bis 10,0 nM.

Tabelle 19 3,5-T₂ CLIA Inter- and Intra-Assay-Variationen

Intra-Assay Variabilität		
Humanes Serum (n=12)	Mittelwert (nM)	Variation (%)
Serum 1	0,6 nM	9,0 %
Serum 2	0,8 nM	8,9 %
Serum 3	1,1 nM	5,0 %
Serum 4	1,4 nM	4,1 %
Inter-Assay Variabilität		
Humanes Serum (n=15)	Mittelwert (nM)	Variation (%)
Serum 1	0,5	12,9%
Serum 2	1,0	6,5%
Serum 3	1,5	5,6%

5.3.6 Stabilität des Analyten im Assay

Die Stabilität des Analyten wurde wiederum im humanen Serum getestet. Die Seren wurden dazu vergleichend für 24 h bei RT, 4 °C oder -20 °C gelagert, wobei die letzte Kondition als Referenz galt. Die Lagerung bei RT ($104,4 \pm 13,2$ %) oder bei 4 °C ($97,9 \pm 9,9$ %) beeinflusst die Stabilität des Analyten nicht ($n=3$ individuelle humane Seren mit niedrigem, mittlerem sowie hohem endogenen 3,5-T₂-Wert). Die dargestellten Variationen der Wiederfindungsraten sind vergleichbar mit jenen, die bei der Intraassay-Variation bestimmt wurden. Zusätzlich dazu wurde die Stabilität des Analyten in Seren untersucht, die vier Mal aufgetaut und wieder eingefroren (-20 °C) wurden. Die relative Wiederfindungsrate wurde wiederum zu der Kontrollkondition des ununterbrochenen Lagerns bei -20 °C kalkuliert. Das wiederholte Auftauen und Einfrieren beeinträchtigt die Stabilität von 3,5-T₂ nicht ($103,0 \pm 13,6$ %; $n=8$ Seren von gesunden humanen Probanden). 3,5-T₂ bleibt im Serum bei verschiedenen Lagerbedingungen und nach mehreren Zyklen des Auftauens und wieder Einfrierens stabil bleibt.

5.3.7 Analyse humaner Seren Schilddrüsen-gesunder Probanden

Es sollte zuerst analysiert werden, ob 3,5-T₂ in Personen ohne auffällige TH-Parameter messbar ist. Die 3,5-T₂-Bestimmung in einer ausreichend grossen euthyreoten populationsbasierten Kohorte bildet die Grundlage einen Referenzbereich für den gemessenen Serumparameter etablieren zu können. In 761 schilddrüsengesunden Patienten (SHIP-TREND) wurde 3,5-T₂ bestimmt (136). Die Median-Serum-Konzentration war 0,24 nM (1. Quartil: 0,20 nM, 3. Quartil: 0,37 nM). Der gemessene Referenzwert ist niedrig und nahe dem bestimmten Detektionslimit (0,2 nM). In 1/3 der untersuchten Kohorte war 3,5-T₂ unterhalb des Detektionslimits. 3,5-T₂ ist signifikant mit Serum-Fastenglukose, TSH und Leptin assoziiert. Es konnte innerhalb der untersuchten Referenzpopulation kein Zusammenhang zu Alter, Geschlecht, Rauchverhalten oder Lipid-Parametern hergestellt werden. Diese Untersuchung bildet die Grundlage für die Festlegung eines 3,5-T₂-Referenzbereiches in einer euthyreoten populationsbasierten Kohorte. Ein Zusammenhang zwischen 3,5-T₂ und Glukosemetabolismus sind wahrscheinlich.

5.3.8 Analyse humaner Patienten-Seren mit primären Schilddrüsenerkrankungen

3,5-T₂ wurde in Seren 31 hypothyreoter und 24 hyperthyreoter Patienten bestimmt. Die gemessenen 3,5-T₂ Serum Konzentrationen waren nicht signifikant verschieden zwischen den beiden Gruppen ($0,43 \pm 0,04$ und $0,31 \pm 0,02$ nM; siehe Abb. 40 A). Die Daten wurden für Alter und BMI gruppenspezifisch adjustiert (siehe Alters- und BMI-Verteilung zwischen den Gruppen in Abb. 40 D-E). Wie erwartet sind fT₄ und fT₃ Serum Werte in den hypothyreoten Probanden signifikant erniedrigt verglichen mit der hyperthyreoten Gruppe (siehe Abb. 40 B-C). Die 3,5-T₂ Konzentrationen im Serum zeigen keine Korrelation zu fT₃ oder zu fT₄ in der hypo- ($P(fT_3) = 0,07$, $r(fT_3) = -0,34$ und P

(fT_4) = 0,16, r (fT_4) = -0,26) und hyperthyreoten Gruppe (P (fT_3) = 0,12, r (fT_3) = -0,35 und P (fT_4) = 0,38, r (fT_4) = -0,21). Aufgrund der Daten kann angenommen werden, dass 3,5- T_2 nicht an der Rückkopplung der TH-Produktion innerhalb der HPT-Achse beteiligt ist.

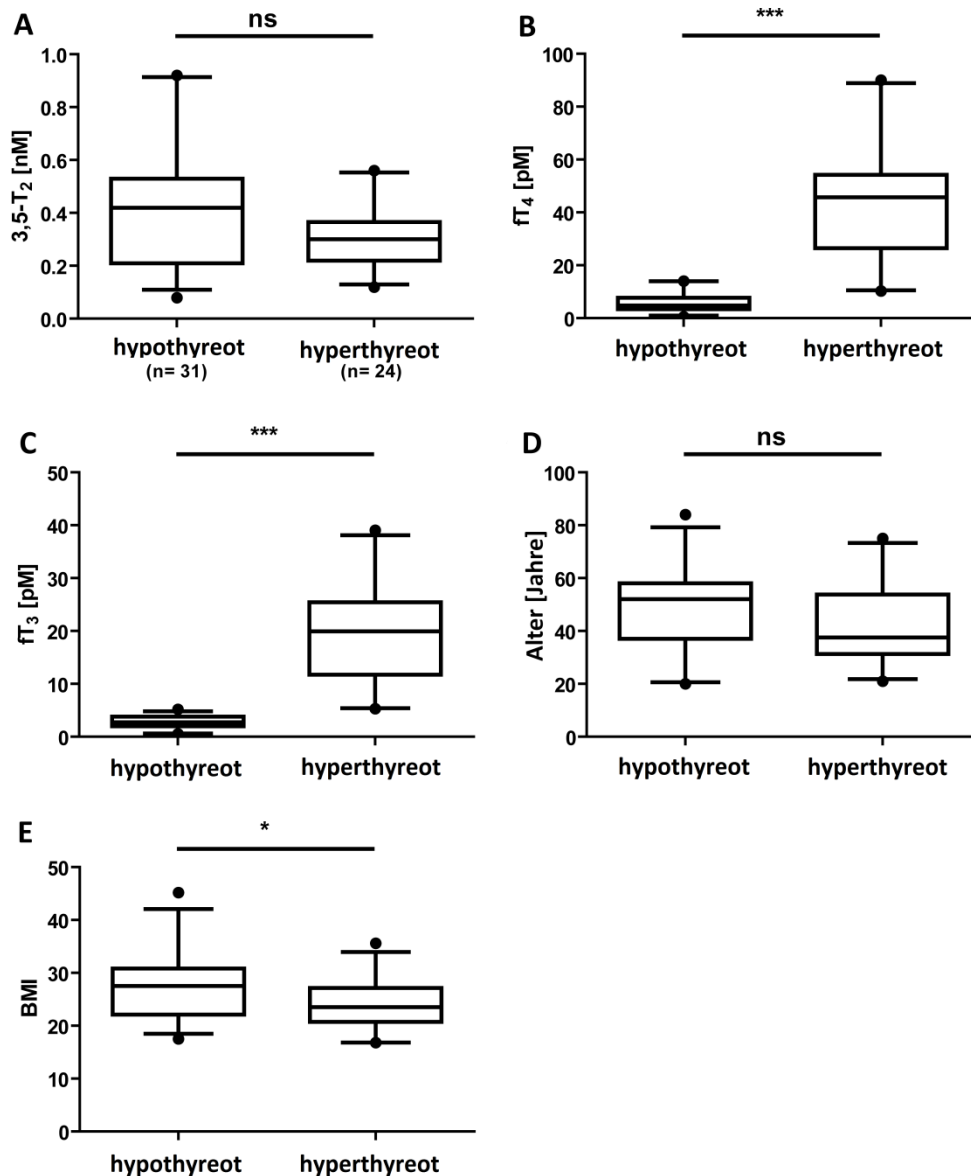


Abb. 40 3,5- T_2 Serum Konzentrationen [nM] in Patienten mit der Initialdiagnose Hypo- oder Hyperthyreose

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Median-Werten zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. 3,5- T_2 Konzentrationen [nM] wurden für Alter und BMI adjustiert. Die statistische Analyse wurde mit einer univariaten Varianzanalyse in SPSS durchgeführt (A). fT_3 und fT_4 Serum Konzentrationen sind signifikant unterschiedlich zwischen den beiden analysierten Gruppen (B-C). Beide Gruppen haben eine vergleichbare Altersverteilung der Patienten und der BMI ist signifikant vermindert in der hyperthyreoten Gruppe (D-E). Whiskers Boxplot (5-95 Perzentile, Individuen ober- und unterhalb des Konfidenzintervalls sind als Punkte dargestellt); ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur; *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$; ns = nicht signifikant. 3,5- T_2 wurde eigenständig im CLIA vermessen. Alle weiteren Daten wurden durch den Kooperationspartner erhoben und als Datensatz für die hier gezeigte Analyse zur Verfügung gestellt.

Es wurden außerdem Seren von thyreodektomierten Schilddrüsen-Krebs Patienten vermessen (n=100, 78 weiblich, 22 männlich) die unter TSH-suppressiver L-T₄ Therapie standen. Die Kontrollgruppe setzte sich aus gesunden Probanden gleichen Alters und gleichen Geschlechts zusammen (siehe Abb. 41). Die thyreodektomierten Patienten hatten signifikant erhöhte 3,5-T₂ Serum Konzentrationen ($0,48 \pm 0,03$ nM) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($0,29 \pm 0,01$ nM) (Abb. 41 A). Innerhalb der Gruppe der Schilddrüsenkrebs-Patienten gab es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede der 3,5-T₂ Serumkonzentrationen (Abb. 41 B). Des Weiteren konnte keine Korrelation zwischen 3,5-T₂ und fT₄ (Spearman $r = -0,08$, $P = 0,89$; Abb. 41 C) oder 3-T₁AM nachgewiesen werden (Spearman $r = -0,01$, $P = 0,63$; Abb. 37 D). Die Daten legen nahe, dass 3,5-T₂ aus T₄ extrathyroidal gebildet wird.

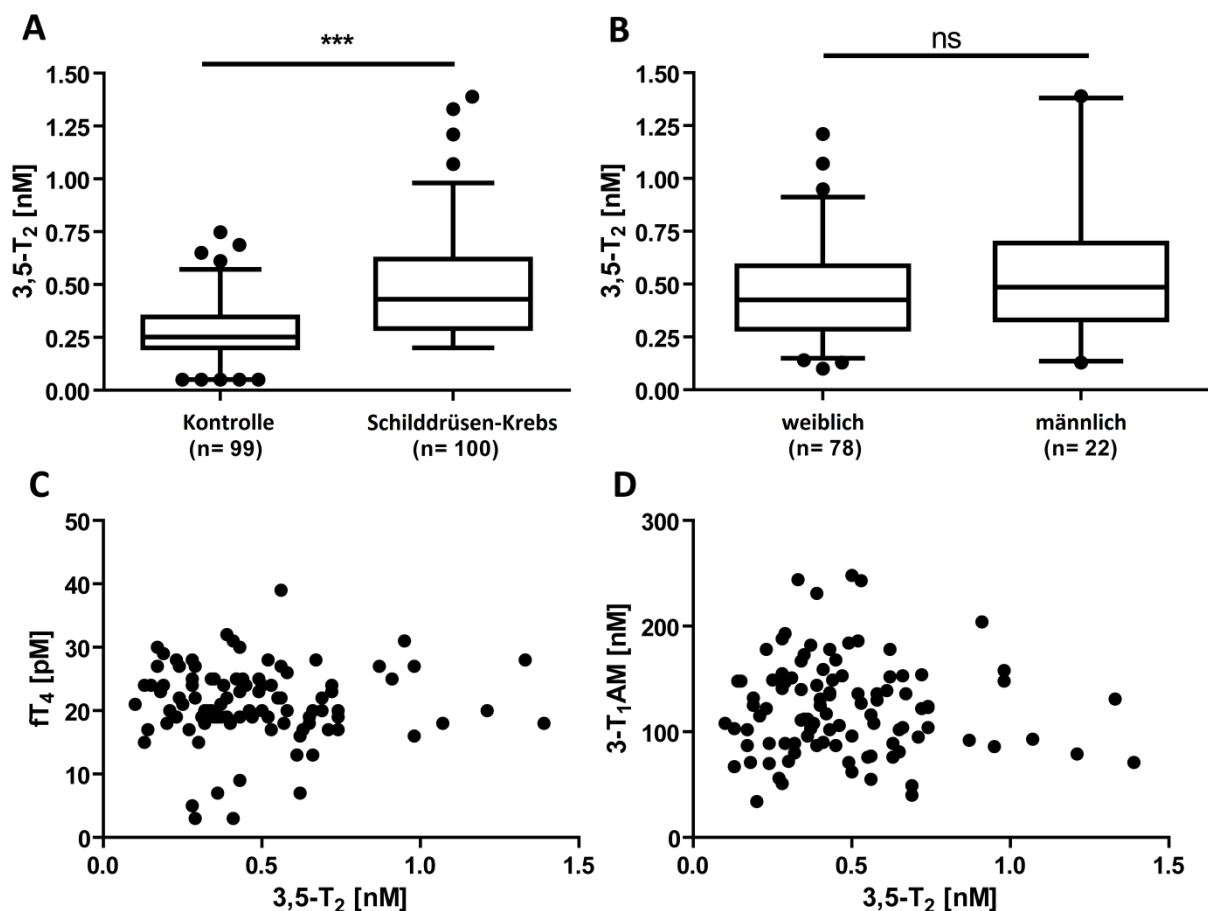


Abb. 41 3,5-T₂ Serum Konzentrationen (nM) in Schilddrüsen-Krebs-Patienten (n=100)

im Vergleich zu einer Alters- (± 2 Jahre) und Geschlechts-angepassten Kontrollgruppe gesunder Probanden (n=99). 3,5-T₂ ist signifikant erhöht in T₄-substituierten Schilddrüsenkrebs-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (A). Innerhalb der Schilddrüsenkrebs-Gruppe sind die 3,5-T₂ Serum Konzentrationen nicht unterschiedlich zwischen den Geschlechtern (B). 3,5-T₂ korreliert nicht mit fT₄ und 3-T₁AM im Serum (Spearman nichtparametrische Korrelation) (C-D). Whiskers Boxplot (5-95 Perzentile, Individuen ober- und unterhalb des Konfidenzintervalls sind als Punkte dargestellt); Zweiseitiger Mann-Whitney Test; ***, $P < 0,001$, ns = nicht signifikant). 3,5-T₂ wurde eigenständig im CLIA vermessen. Alle weiteren Daten wurden durch den Kooperationspartner erhoben und als Datensatz für die hier gezeigte Analyse zur Verfügung gestellt.

5.3.9 Analyse humaner Patienten-Seren mit sekundärer Schilddrüsenerkrankung

Die Niere ist nicht nur ein Zielorgan für TH, sondern trägt signifikant zu deren Speicherung, Metabolismus und Elimination bei (138). Das hier untersuchte Kollektiv von Dialysepatienten mit unterschiedlichem diagnostischen Hintergrund zeichnete sich durch eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate sowie erhöhte Kreatinin-Werten in der Zirkulation aus. Das nephrotische Syndrom wird begleitet durch das Niedrig-T₃ Syndrom, das sich durch niedrige fT₃-, sowie fT₄-Werte am unteren Ende des Referenzbereiches auszeichnet. rT₃ kann, muss aber nicht verändert sein. TSH ist ebenfalls unverändert (139).

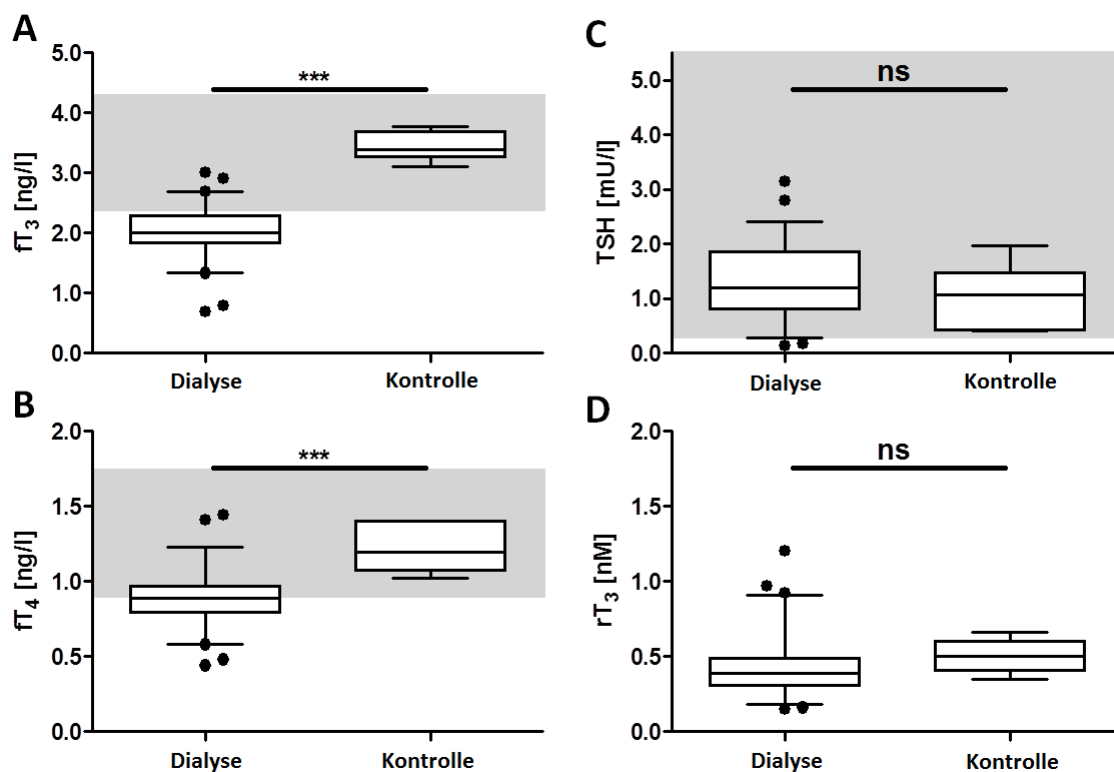


Abb. 42 Dialysepflichtige Patienten (n=61)

fT₃ [ng/l] (A), fT₄ [ng/l] (B), TSH [mU/l] (C), rT₃ [nM] (D) wurden im humanen Serum gemessen. TSH-Daten: ein Wert fehlend & drei hohe Werte (9,25, 10,04, 5,03 mU/l) von der Analyse ausgeschlossen (fT₃ & fT₄ innerhalb des Referenzbereiches). Kontrollen (n=6). Statistik: ***, P<0,001; *, P<0,05; ns = nicht signifikant; Datendarstellung als Whiskers Boxplot (5-95 Perzentile, Individuen ober- und unterhalb des Konfidenzintervalls sind als Punkte dargestellt); nicht-parametrischer t-Test (Mann Whitney U Test, zweiseitig; Referenzbereiche für fT₃, fT₄ und TSH als graue Box. 3,5-T₂ und rT₃ wurden eigenständig mit 3,5-T₂-CLIA und rT₃ RIA vermessen. Alle weiteren Daten wurden durch den Kooperationspartner erhoben und als Datensatz für die hier gezeigte Analyse zur Verfügung gestellt.

Die erhobenen freien TH-Parameter der Dialysepatienten zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Kontrollpopulation. fT₃- ($2,00 \pm 0,06$ ng/l, Abb. 42 A) und fT₄-Werte ($0,89 \pm 0,02$, Abb. 42 B) sind stark vermindert und am unteren Ende des jeweiligen Referenzbereiches im Vergleich zur Kontrollpopulation (fT₃ = $3,44 \pm 0,10$ ng/l; fT₄ = $1,22 \pm 0,07$ ng/l, Abb. 38 A & B). TSH zeigt keine

Unterschiede zwischen den Gruppen (Dialyse = $1,30 \pm 0,09$ ng/l sowie Kontrollgruppe = $1,04 \pm 0,24$ ng/l, Abb. 42 C). Unabhängig von der Dialysepflicht sind die gemessenen Werte im Referenzbereich. Es konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Dialyse- ($0,42 \pm 0,02$ nM) und der Kontrollgruppe ($0,50 \pm 0,05$ nM) bezüglich rT_3 , als Metabolit des T_4 s, festgestellt werden. Die Daten zeigen, dass die untersuchte Dialysekohorte die oben beschriebenen Kriterien eines Niedrig- T_3 Syndroms erfüllt. Die ursächlichen Gründe können gerade bei chronisch kranken Patienten vielfältig sein und können im Rahmen dieser Arbeit nicht gänzlich untersucht werden.

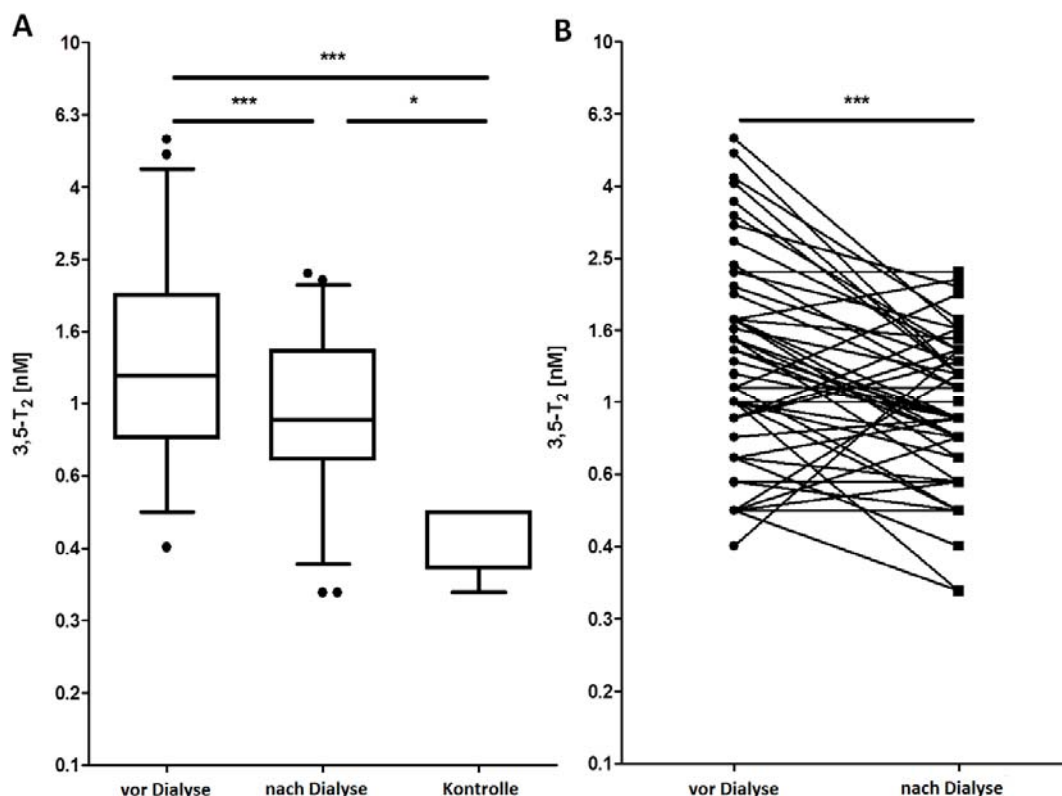


Abb. 43 3,5- T_2 Messungen im humanen Serum vor und nach Dialyse

(n=51; 10 Werte wurden ausgeschlossen wegen nicht erklärbarer hoher 3,5- T_2 -Werte oberhalb der Standardreihe) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=5, ein Wert wurde als signifikanter Outlier ausgeschlossen). (A) 3,5- T_2 ist nach der Dialyse in den meisten Patienten vermindert (B). Datendarstellung als Whiskers Boxplot (5-95 Perzentile, Individuen ober- und unterhalb des Konfidenzintervalls sind als Punkte dargestellt). Statistik: *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$; Gepaarter t-Test (Wilcoxon Rank-Summen Test) für den Vergleich 3,5- T_2 vor und nach Dialyse; Kruskal-Wallis Test wurde verwendet um die Dialyse-Patienten mit der Kontrollgruppe zu vergleichen.

In einer zusätzlichen Analyse wurde 3,5- T_2 als weiterer TH-Metabolit in den Proben vor und nach Dialyse sowie den zugehörigen Kontrollen bestimmt (siehe Abb. 43). Die Ergebnisse zeigten, dass 3,5- T_2 in den dialysepflichtigen Patienten vor ($1,5 \pm 0,13$ nM) sowie nach der Dialyse ($1,0 \pm 0,07$ nM) signifikant erhöht ist im Vergleich zur nicht-Dialyse Gruppe ($0,44 \pm 0,04$ nM, siehe Abb. 43 A).

Auffällig ist weiterhin, dass es nach Dialyse zu einem signifikanten Absinken des 3,5-T₂s in der Zirkulation kommt. Dieser Wert ist allerdings immer noch deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Abbildung 43 B zeigt, dass diese dialyseabhängige Senkung der 3,5-T₂ Werte nicht in jedem, aber doch den meisten Probanden nachzuweisen war (n=33 Senkung, n=11 Steigerung, n=5 unverändert). Die geringen fT₃ und fT₄ Werte könnten durch den Umsatz zu 3,5-T₂ erklärt werden. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass es einen starken linearen inversen Zusammenhang zwischen 3,5-T₂ und fT₃-Werten in den Dialyse-Patienten gibt (siehe Abb. 44). Bezüglich fT₄ ist ein vergleichbarer, aber nicht signifikanter Trend vorhanden (Abb. 44 B).

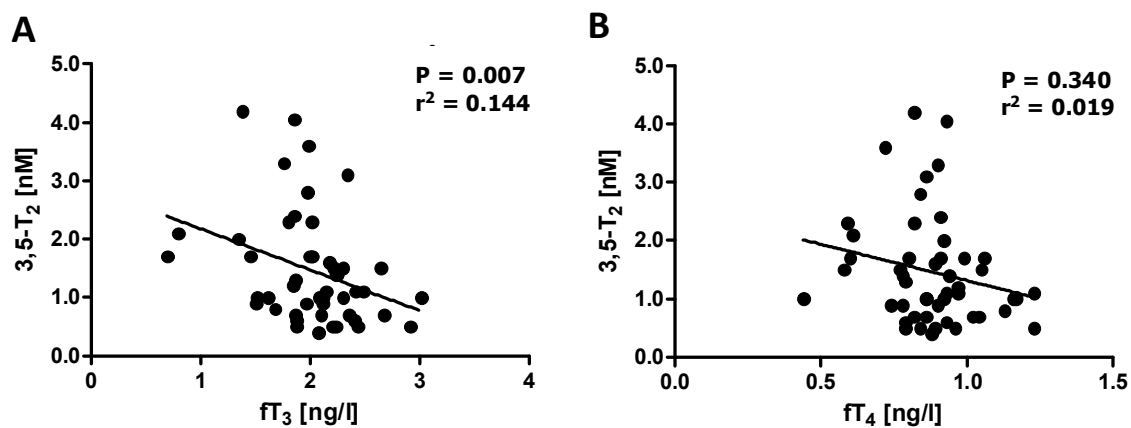


Abb. 44 Patienten mit chronischer Nierenerkrankung

Niedrige fT₃ und fT₄ Werte sind linear korreliert mit hohem 3,5-T₂ (A & B; Daten vor Dialyse). Statistik: nicht-parametrische Korrelation; n=51, 10 Werte wurden ausgeschlossen wegen nicht erklärbarer hoher 3,5-T₂-Werte oberhalb der Standardreihe. 3,5-T₂ wurde eigenständig im CLIA vermessen. Alle weiteren Daten wurden durch den Kooperationspartner erhoben und als Datensatz für die hier gezeigte Analyse zur Verfügung gestellt.

6. Diskussion

TH-Metabolite sind endogene Signalmetabolite mit biologischer Wirkung auf beispielsweise Energiemetabolismus, Glukose- und Lipidstoffwechsel. Es gibt ein großes Netzwerk von TH-Metaboliten die durch mehrstufigen Metabolismus aus T_3 und T_4 entstehen. Der Fokus der Forschung auf diesem Gebiet konzentriert sich auf 3- T_1 AM und davon abgeleitete Metabolite sowie 3,5- T_2 . Pharmakologische Konzentrationen dieser Substanzen haben biologische Effekte, andererseits sind sie auch endogen in der Blutzirkulation und unterschiedlichen Geweben nachweisbar. Eine Reihe von Fragen zu Metabolismus und Wirkung der TH-Metabolite sind immernoch unbeantwortet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte einerseits eine antikörperbasierte Nachweismethoden für den TH-Metabolit 3,5- T_2 entwickelt werden und zum Anderen der Einfluss von TH-Metaboliten auf den hepatozellulären und pankreatischen Energiestoffwechsel untersucht werden.

6.1 Glukoregulatorische Funktion des 3- T_1 AMs und seinen Metaboliten

Anhand eines *in vitro* Zellkultursystems sollten Aufnahme, Wirkung, Metabolismus und zugrundeliegende Wirkmechanismen von 3- T_1 AM auf pankreatische β -Zellen der Maus (MIN6) untersucht werden.

6.1.1 Zelluläre Aufnahme von 3- T_1 AM

Mittels LC-MS/MS konnte nachgewiesen werden, dass 3- T_1 AM in die gewählte Zelllinie aufgenommen wird. Der Nachweis erfolgte durch den intrazellulären Umsatz des 3- T_1 AMs zu TA_1 . Unter Anwesenheit eines unspezifischen Aminoxydaseinhibitors (Iproniazid) wurde kein TA_1 aus 3- T_1 AM gebildet. In der Expressionsanalyse wurde nach MaoA und MaoB gesucht, jedoch konnte nur MaoB nachgewiesen werden. 3- T_1 AM wird durch dieses Enzym intrazellulär zu TA_1 umgesetzt. Ob 3- T_1 AM die Plasmamembran transporterabhängig oder über einen anderen Mechanismus überwindet, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht untersucht werden, soll aber an dieser Stelle diskutiert werden.

6.1.1 a) potenzielle 3- T_1 AM-Transporter

Nicht viel ist publiziert über die 3- T_1 AM-Aufnahme in die Zelle und es gibt keinerlei publizierte Daten zu Aufnahme und Export von TA_1 . Es gab einige wenige Versuche heraus zu finden, welcher oder welche Transporter möglicherweise 3- T_1 AM über die Plasmamembran transportieren. Mit einem „large-scale RNA interference screen“ wurde beispielsweise die gesamte humane SLC-Familie der Transportergene untersucht (116). Dabei wurden acht ganz unterschiedliche Kandidaten-Transporter

identifiziert (siehe Tabelle 12). Allen gemein ist, dass sie Thyronamin spezifisch sind und ihr Transport abhängig von Na^+ / Cl^- sowie dem pH-Wert ist. Wie bereits im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit aufgelistet sind dies SLC7A1, SLC16A7, SLC17A5, SLCO3A1, SLCO4A1, SLC9A2, SLC31A1 und SLC43A3. Drei davon sollen im humanen und murinen Pankreas exprimiert sein: Slco3a1, Slc7a1 und Slc31a1. Die letzten beiden sind in isolierten pankreatischen Inseln der Maus und in MIN6-Zellen vorhanden und im Vergleich zu allen anderen nachgewiesenen Transportern hoch exprimiert. Dass sie an der Aufnahme des 3-T₁AMs beteiligt sind ist spekulativ, wurde bis jetzt aber nicht weiter untersucht. Ein eindeutiger Beweis kann der einfache sowie kombinierte knockdown (kd) der genannten drei Transporter in demselben Zellmodel bei erneuter Untersuchung der zellulären Aufnahme und Verstoffwechselung von 3-T₁AM erbringen. Ein kombinierter kd wäre notwendig da in der hier diskutierten Publikation darauf verwiesen wird, dass mit grosser Wahrscheinlichkeit mehr als ein Transporter an der 3-T₁AM-Aufnahme direkt oder indirekt (durch Ionen-Transport oder Regulation des pH-Wertes gleichzeitig zum 3-T₁AM-Transport) beteiligt ist. Dies wäre vergleichend mit anderen Thyroninen auch logisch, da ein sättigbarer Mechanismus kritisch für die Aufrechterhaltung der physiologischen Kontrolle ist. T₃ und T₄ werden ebenfalls durch mehr als einen Transporter wie MCT8, MCT10, LAT1 und LAT2 in Abhängigkeit von deren Expression in unterschiedliche Gewebe aufgenommen. Ob einer der genannte Transporter ebenfalls an dem TA₁-Export beteiligt ist kann nur spekuliert werden, da Aufnahme und Exportstudien zu TA₁ bis jetzt nicht vorhanden sind. Dass TH-Transporter, wie MCT10, Import und Export von TH bewerkstelligen, wurde bereits nachgewiesen (140).

6.1.1 b) Hemmung der transporterabhängigen Thyronin-Aufnahme durch 3-T₁AM

T₃ selbst ist ein essenzieller Wachstumsfaktor, reguliert den zellulären Metabolismus, was zu einem verbesserten Zellwachstum führt. Typ1 Diabetes führt zu einer Zerstörung der pankreatischen β -Zellen, wobei Apoptose eine große Rolle spielt. Falzacappa *et al.* testeten in pankreatischen β -Zelllinien (Ratte und Mensch) und primären pankreatischen Inseln der Ratte ob T₃ einen anti-apoptotischen Effekt auf β -Zellen in Kultur hat (141-143). Sie konnten zeigen, dass T₃ die Zellproliferation stimuliert, die Zellzahl steigert und die Zellviabilität verbessert. Dies geschieht durch Interaktion des T₃s mit TR β 1 wodurch nachfolgend pro- und anti-apoptotische Faktoren reguliert werden. Die Effekte sind PI3K und pAkt308 abhängig. Diese Untersuchungsergebnisse zeigen, wie die Aufnahme der TH in die pankreatische β -Zelle zum Überleben und zum Erhalt der Funktionsfähigkeit beiträgt. Essenziell dafür ist der gesicherte TH-Transport über die Plasmamembran mittels TH-Transportern. 2010 wurde gezeigt, dass 3-T₁AM den Transport von T₃ und T₄ durch OATP1A2 (IC₅₀ = 0,27 und 2,1 μM), den T₄ Transport durch OATP1C1 (IC₅₀ = 4,8 μM), sowie die T₃- und T₄-Aufnahme durch MCT8 (IC₅₀ = 95,0 und 31,0 μM) hemmen kann (85). Dies kann ein indirekter

Hinweis auf Substanztransport sein oder aber eine Blockierung des untersuchten Transporters darstellen. 3-T₁AM könnte theoretisch durch Transporter-Blockierung aufgrund der oben genannten Daten die Funktion der β -Zelle einschränken, was bis jetzt nicht untersucht wurde. 3-T₁AM hatte keine Auswirkungen auf die MCT10-Transporteigenschaften (85). Keiner der in der Publikation analysierten OATPs ist im humanen Pankreas exprimiert (EST-Profile Analyse NCBI). OATP1A2, 1B3 und 1C1 sind im gesunden Pankreas nicht nachweisbar, können aber im Pankreas-Karzinom vermehrt nachgewiesen werden (144). In MIN6-Zellen konnte beispielsweise Oatp1c1 nicht nachgewiesen werden. Lediglich Slco4c1 und 1a5 waren in MIN6-Zellen und Langerhansschen Inseln der Maus gar nicht oder nur sehr schwach nachweisbar. Der Beitrag dieser Transporter an der 3-T₁AM-Aufnahme in die pankreatische β -Zelle ist sehr unwahrscheinlich. Mct8 ist ebenfalls sehr schwach in MIN6 Zelle und murinem Pankreas exprimiert. 3-T₁AM-Transport ist ausserdem unwahrscheinlich, da der in der Publikation (85) beschriebene IC₅₀-Wert weit über den 3-T₁AM-Konzentrationen liegt, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Trotzdem die Mct10-Expression in isolierten Inseln und in MIN6 Zellen im Vergleich zu Mct8 sehr hoch ist, ist auf Grundlage der Literatur zu vermuten, dass MCT10 für den Transport anderer Thyronine, jedoch nicht für 3-T₁AM zuständig ist.

6.1.1 c) Endozytose und GPCR-Bindung als Mechanismen der Aufnahme

Als weiterer Mechanismus der zellulären 3-T₁AM-Aufnahme ist die ApoB100 vermittelte Endozytose durch den LDL-Rezeptor beschrieben worden (115, 145). 3-T₁AM wurde in der Zirkulation zu 90 % an ApoB100 gebunden in LDL-Partikeln transportiert. Die Bindung an ApoB100 ist reversibel und durch eine niedrige Dissoziationskonstante von 17 nM gekennzeichnet. Die zelluläre Aufnahme des 3-T₁AMs wurde durch die Anwesenheit von ApoB100-haltigen Lipoprotein-Partikeln deutlich gesteigert. Diese Interaktion gibt eine Erklärung dafür wie man sich die Transporter-unabhängige Aufnahme des 3-T₁AMs vorstellen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings alle Inkubationsschritte ohne ApoB100 durchgeführt und es kommt unabhängig davon zu einer schnellen Aufnahme von 3-T₁AM in die Zielzelle. Zusätzlich zu der Vermutung, dass nicht nur ein Transporter für des 3-T₁AM-Aufnahme in Zielzellen verantwortlich ist, sollte ausserdem in Betracht gezogen werden, dass es weitere Transporter-unabhängige Mechanismen geben kann. In diesem Kontext sei auch die Bindung GPCRs mit anschließender Internalisierung als Mechanismus der zellulären Aufnahme genannt, die vergleichbar mit der LDL-Rezeptor-vermittelten Endozytose ist. Beide Transporter-unabhängigen Mechanismen der Aufnahme erfordern eine intrazelluläre lysosomale Freisetzung des Zielmetaboliten um ihn für den Metabolismus und die weitere Bindung an Zielstrukturen, wie z.B. Mitochondrien, zur Verfügung zu stellen.

6.1.2 Intrazellulärer Metabolismus und Konsequenzen für die Insulinsekretion

3-T₁AM wird innerhalb kürzester Zeit aufgenommen und intrazellulär MaoB-abhängig zu TA₁ verstoffwechselt. Die TA₁-Produktion kann Inhibitor-spezifisch unterbunden werden. TA₁ wird mit der Zeit in steigender Konzentration aus der Zelle abgegeben. Trotz Export bleibt die intrazelluläre TA₁-Konzentration signifikant erhöht. Werden MIN6-Zellen mit 3-T₁AM inkubiert, so sinkt die Glukose-stimulierte Insulin-Sekretion. Eine Beteiligung von TA₁ an der Modulation der Insulinsekretion kann nicht ausgeschlossen werden.

Dass die 3-T₁AM-Aufnahme in Zielzellen stattfindet wurde bereits mehrfach beschrieben und ist in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich beschrieben. Ebenso sind dort alle Publikationen genannt, in denen der Umsatz zu TA₁ bis jetzt beschrieben wurde. Hier soll exemplarisch auf Literatur eingegangen werden, die in direktem Zusammenhang zu den Ergebnissen dieser Arbeit steht. Ghelardoni *et al.* zeigten, dass 3-T₁AM in HepG2 Zellen aufgenommen und zu TA₁ verstoffwechselt wird (121). TA₁ akkumulierte nach Bildung sowohl im Medium als auch im HepG2-Zellysat, so dass sich auf beiden Seiten der Zellmembran die gleiche Konzentration einstellt. Im Gegensatz dazu zeigte sich hier in MIN6 Zellen, dass TA₁ in der Zelle nur bis zu einer bestimmten Konzentration akkumuliert, TA₁ dann exportiert wird und als ein Vielfaches extrazellulär angereichert wird. In der gleichen Publikation für HepG2 Zellen zeigte sich, dass 3-T₁AM die Glukoneogenese anregt, jedoch nur solange der Mao-abhängige Umsatz zu TA₁ nicht unterbunden ist. Die direkte Inkubation mit TA₁ allein hatte jedoch keinen Effekt. Der Grund dafür wird nicht weiter erörtert. 3-T₁AM (i.c.v.) abhängige Hyperglykämie, Reduktion der Serum fT₃-Werte, Verbesserungen der Lernkapazität sowie verminderte Schmerzsensitivität gegen heiße Stimuli konnten bei Chlorgylyngabe (hemmt MaoA und MaoB; i.p. Injektion) nicht mehr nachgewiesen werden oder waren signifikant verändert (42, 113). TA₁ direkt wurde aber in diesem Zusammenhang nicht getestet. Ähnliches konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Die GSIS sowie der mitochondriale ATP-Umsatz wurden durch 3-T₁AM signifikant erniedrigt. Ist die TA₁-Bildung durch Mao-Inhibition unterdrückt, ist der 3-T₁AM-Effekt in der GSIS deutlich weniger ausgeprägt. Die direkte Inkubation der MIN6-Zellen mit TA₁ hatte keinen Einfluss auf den mitochondrialen ATP-Umsatz. Es kann anhand dieser Daten nicht ausgeschlossen werden, dass TA₁ selbst eine Wirkung hat. Es scheint allerdings von Bedeutung zu sein, dass TA₁ intrazellulär durch Mao gebildet und nicht direkt aufgenommen wird. Ein Grund dafür könnte sein, dass es keinen Transporter für TA₁ in die Zelle gibt, womit 3-T₁AM als Shuttle dienen könnte um die Zellmembran zu überbrücken. Der intrazelluläre Umsatz zu TA₁ kann lokal für die Regulation der 3-T₁AM-Konzentration notwendig sein wenn zu viel 3-T₁AM zur Verfügung steht bzw. unspezifisch aufgenommen wird. TA₁ wird überwiegend durch Export aus der Zelle gebracht und im

Medium angereichert. Intrazellulär bleibt TA_1 trotzdem weiterhin signifikant erhöht. Weitere Untersuchungen sind notwendig um die Zusammenhänge eindeutig zu klären.

Im Gegensatz zu HepG2 wird 3- T_1 AM in perfundierten Hepatozyten zu T_0 AM und nicht TA_1 umgesetzt. Es ist nicht bekannt, dass es bei den vorliegenden Untersuchungen zu einer ähnlichen Diskrepanz im Metabolismus zwischen murinem Pankreas und MIN6 Zellen kommen kann. Es ist lediglich bekannt, dass 3- T_1 AM nach lokaler Applikation auch den Pankreas erreicht aber keine weiteren Metabolite von 3- T_1 AM *in vivo* untersucht werden konnten (114). Vergleichbare Enzymausstattung (Dio und Mao) und Transporterexpressionen geben einen Hinweis darauf, dass die gewählte Zelllinie und der murine Pankreas große Gemeinsamkeiten aufweisen.

6.1.3 Wirkmechanismus – Plasmamembranbindung vs. zelluläre Aufnahme

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufnahme des 3- T_1 AMs in die Zelle untersucht. Die Exposition mit 3- T_1 AM reguliert den ATP-Umsatz in den Mitochondrien einerseits und senkt die GSIS andererseits. Der Einfluss der 3- T_1 AM-Bindung an GPCRs oder TAARs an der Plasmamembran kann nicht ausgeschlossen werden. Die Aufnahme und intrazelluläre Wirkung an den Mitochondrien stellt damit in der pankreatischen β -Zelle einen neuen Weg zur Regulation der Glukosehomeostase dar.

Regard *et al.* hatten bereits 2007 untersucht, welche Rolle GPCRs bei der 3- T_1 AM-vermittelten Insulinsekretion spielen (110). Sie konnten zeigen, dass 3- T_1 AM die Insulinsekretion negativ über G_i -gekoppelte $ad\alpha_{2\alpha}$ und positiv über G_s -gekoppelte TAAR1 Rezeptoren beeinflussen kann. In der Maus konnten sie zeigen, dass die einmalige Applikation von 50 mg / kg i.p., wie schon von Scanlan *et al.* beschrieben (37), Hyperglykämie und Hypoinsulinämie verursacht. Unter Inhibition der G_i -gekoppelten Signalwege spezifisch in pankreatischen β -Zellen blieben die genannten 3- T_1 AM-stimulierten Effekte auf den Glukosestoffwechsel *in vivo* aus. *In vitro* Versuche mit isolierten primären Inselzellen der Maus und des Menschen zeigten, dass 3- T_1 AM (10 μ M) die GSIS inhibiert und dieser Effekt durch die Unterdrückung der $G_{i/o}$ -gekoppelten Signalwege aufgehoben wurde. Da bereits zuvor bekannt war dass 3- T_1 AM an Taar1 bindet und intrazellulär den cAMP Spiegel erhöht (37) wurde in diesem Zusammenhang dessen Interaktion mit G_i als mögliche Erklärung der Effekte getestet, jedoch erfolglos. Daraus wurde geschlossen, dass es einen anderen GPCR geben muss, der $G_{i/o}$ koppelt und durch 3- T_1 AM-Bindung aktiviert wird. Zusätzlich zu TAAR1 ist in pankreatischen Inselzellen $ad\alpha_{2\alpha}$, der bekanntermaßen $G_{i/o}$ koppelt, hoch exprimiert und 3- T_1 AM hat ausserdem strukturelle Verwandtschaft mit dessen Aktivator, den Catecholaminen. Membran-Bindungsstudien zeigten, dass 3- T_1 AM genauso gut bzw. besser an $ad\alpha_{2\alpha}$ bindet im Vergleich zu Epinephrin. Ausserdem war 3- T_1 AM in $ad\alpha_{2\alpha}$ -null-Mäusen nicht in der Lage den bekannten hyperglykämischen Effekt auszulösen. Eine zentrale Steuerung des hyperglykämischen Effekts durch $ad\alpha_{2\alpha}$ -Expression in Neuronen konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Diese Daten weisen stark darauf hin, dass 3-

T₁AM eine Hyperglykämie Adra_{2α}-abhängig, sowie G_{i/o}-gekoppelt, direkt im Pankreas vermittelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung des 3-T₁AMs an membranständige Rezeptoren nicht bearbeitet, da sich schon früh zeigte, dass eine schnelle Aufnahme sowie ein reger Metabolismus zu TA₁ nachweisbar waren. Der Fokus ist die Aufnahme und intrazelluläre Wirkung des 3-T₁AMs und seinem Metabolit. Jedoch ist es möglich, dass plasmamembran-initiierte und nachfolgende intrazelluläre Signalwege zu einer Hypoinsulinämie beitragen. Es ist denkbar, die in dieser Arbeit beschriebenen GSIS -Versuche noch einmal in Adra_{2α} knock down-MIN6 Zellen zu wiederholen. Dies wäre eine elegante Methode um den Einfluss der GPCRs auf die gezeigten Ergebnisse heraus zu filtern. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die verwendeten Konzentrationen (10 und 100 nM 3-T₁AM) und ob sie überhaupt zu einer Aktivierung des Adra_{2α} führen oder dazu ausschliesslich höhere Konzentrationen notwendig sind. Die Literatur zeigt, dass 3-T₁AM in pharmakologischen Konzentrationen sicherlich ein Aktivator der GPCRs an der Plasmamembran ist. Die Daten dieser Arbeit legen aber nahe, dass es weitere Wege der 3-T₁AM-stimulierten Insulinsekretion geben kann.

6.1.4 Mitochondrien als 3-T₁AM Zielstruktur

Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass 3-T₁AM nach zellulärer Aufnahme bis zu den Mitochondrien gelangt. Konzentrationsabhängig kommt es zu einer Senkung des ATP-Umsatzes. Vergleichsweise wurde TA₁ direkt appliziert, was zu keiner signifikanten Änderung der mitochondrialen ATP-Produktion führte. Daher wird vermutet, dass 3-T₁AM selbst die Mitochondrien als Zielstruktur erreicht und moduliert. Die TA₁-Aufnahme in die Zelle konnte allerdings nicht untersucht werden.

3-T₁AM wurde bereits als nicht-kompetitiver Inhibitor der F₀/F₁-ATP Synthase in der Literatur beschrieben. Wie bereits durch Venditti den isolierten Leber-Mitochondrien von hypothyreoten Ratten gezeigt wurde, senkt die 3-T₁AM-Inkubation die Sauerstoffaufnahme und steigert die H₂O₂-Bildung (109). Es konnten zwei verschiedene Bindungsstellen innerhalb der mitochondrialen Atmungskette für 3-T₁AM mit unterschiedlichen Affinitäten nachgewiesen werden (108). Kinetische Analysen an sub-mitochondrialen Partikeln, löslicher ATPase, membranständiger F₀/F₁-ATPase sowie 3-T₁AM inkubierten permeabilisierten Cardiomyocyten (H9c2) zeigten, dass 3-T₁AM in niedrigen Konzentrationen einen positiven Effekt auf die mitochondriale Energieproduktion hat. Dagegen zeigt die Stimulation mit hohen Konzentrationen eine favorisierte 3-T₁AM-Bindung an der niedrig affinen Bindungsstelle der F₀/F₁-ATPSynthase. Das Enzym wird dabei blockiert, was zu einem verringerten ATP-Umsatz führt. In intakten MIN6-Zellen konnte gezeigt werden, dass es konzentrationsabhängig im Bereich 10 nM bis 1 µM zu einer signifikanten Inhibition des ATP-Umsatzes nach Zugabe von Oligomycin an den Mitochondrien kam im Vergleich zur DMSO-Lösungsmittelkontrolle. Bis 5 min reichern die pankreatischen β-Zellen 3-T₁AM in der Zelle in

steigender Konzentration an ohne dass ein Export erfolgt. Aus den Daten schließen wir, dass die 3-T₁AM-Konzentration an den Mitochondrien mechanistisch der Bindung an die niedrig affine Bindungsstelle und Blockierung der ATP-Synthase entspricht. Die Definition von hohen und niedrigen Konzentrationen muss dabei sicherlich spezifisch für die verwendete Zielzelle und das gewählte Modellsystem festgelegt werden.

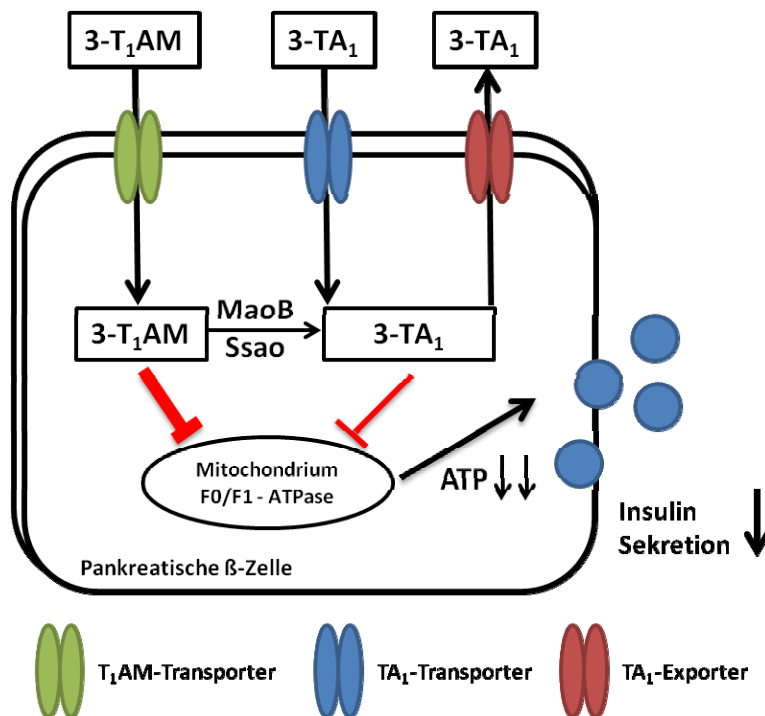


Abb. 45 Schematische Darstellung der 3-T₁AM Wirkung in MIN6-Zellen als pankreatisches β-Zellmodell

3-T₁AM passiert transporterabhängig die Plasmamembran, wird intrazellulär durch Monoaminoxidasen zu TA₁ umgesetzt, welches durch einen unbekannten Exporter wieder die Zelle verlässt. 3-T₁AM sowie teilweise TA₁ selbst binden an Zielstrukturen im Mitochondrium und senken den ATP-Umsatz. ATP als Signalmolekül senkt die Glukose-stimulierte Insulinsekretion.

6.1.5 Humanrelevanz

In der Literatur ist eine Humanstudie beschrieben, in der Zusammenhang von 3-T₁AM und Diabetes Mellitus untersucht wurde (112). In dieser Studienkohorte konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen 3-T₁AM und fT₄, tT₄, fT₃ und tT₃ nachgewiesen werden (n=42). In einer Subpopulation (n=18) wurde auf Typ 2 Diabetes getestet. Endogene 3-T₁AM-Serumkonzentrationen waren in den sieben diagnostizierten Diabetes Patienten signifikant erhöht im Vergleich zu den nicht-diabetischen Patienten (n=18). Des Weiteren konnte ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen 3-T₁AM und HbA_{1c} sowie zum Nüchternblutzucker nachgewiesen werden. Die Schlussfolgerung aus den Daten ist, dass Personen mit erhöhten 3-T₁AM Werten in der Zirkulation hyperglykämisch in Kombination mit einer beeinträchtigten Insulinsekretion sind. Sicherlich handelt es sich bei der Publikation um eine sehr kleine untersuchte Population und die Untersuchung der gleichen

Zusammenhänge in einer größeren Studie diabetischer Patienten ohne kardiale Beschwerden oder Vorbelastungen ist notwendig um die Daten zu bestätigen. Trotzdem lassen sich diese Ergebnisse aus der Humanstudie mit den in dieser Arbeit beschriebenen direkten lokalen Effekten von 3-T₁AM an den pankreatischen β -Zellen in Einklang bringen. Die Exposition mit 10-100 nM 3-T₁AM führte zu einer signifikant verringerten GSIS. Dies würde systemisch zur Hyperglykämie beitragen.

6.2 3,5-T₂-abhängige Aktivierung von Mitochondrien in Hepatozyten

6.2.1 Auswahl des Zellmodels

Die 3,5-T₂-Wirkung *in vivo* und *in vitro* (siehe Einleitung 1.5.1) ist in Hepatozyten gut charakterisiert. Ein häufig genutztes und oft publiziertes humanes Modellsystem zur Untersuchung hepatozellulärer Effekte ist die Zelllinie HepG2. Die Ausstattung der Zellen mit TH-Transportern war unbekannt. Deren An- oder Abwesenheit stellt die entscheidende Barriere für die intrazelluläre TH-Wirkung dar. Um den Metabolismus des 3,5-T₂s davon isoliert untersuchen zu können wurden in der Literatur HepG2-Zellhomogenate genutzt (98). In weiteren Versuchen mit HepG2 wurde einfach angenommen, dass 3,5-T₂ nach 2-3h Inkubation in die Zelle aufgenommen wird, und dort beispielsweise MAPK, p38 und Akt reguliert werden (146). Diese Effekte können allerdings auch ohne Aufnahme von 3,5-T₂ in die Zelle durch plasmamembranständige Integrine (α v β 3) vermittelt werden, was innerhalb kürzester Zeit beispielsweise MAPK reguliert (53, 147). Gleichzeitige intra- und extrazelluläre Aktivierung von Signalwegen ist nicht auszuschließen.

6.2.2 TH-Transport über die Plasmamembran

Die Aufnahme des 3,5-T₂s in die Zelle ist die Grundvoraussetzung für die Regulation der mitochondrialen Aktivität. Ein 3,5-T₂-Transporter ist nicht identifiziert und publiziert. In der Literatur ist lediglich beschrieben dass 3,5-T₂ die T₃-Aufnahme durch MCT10 blockiert, was ein Hinweis auf Transport sein kann (85). Soll die Aufnahme von 3,5-T₂ mit LC-MS/MS nachgewiesen werden, so kann zwischen Plasmamembranbindung und intrazellulärem 3,5-T₂ nicht oder nur durch deutlichen enzymatischen Umsatz (siehe Umwandlung 3-T₁AM zu TA₁) unterschieden werden. 3,5-T₂ zeigte keinen nennenswerten Metabolismus in HepG2 Zellen (Daten nicht gezeigt) wodurch dieser Zusammenhang nicht weiter untersucht werden konnte. Sicher ist jedoch, dass HepG2 und vergleichbare hepatozelluläre Systeme eine deutlich beschränkte TH-Transporter-Expression aufweisen im Vergleich zu muriner Leber oder isolierten primären Hepatozyten.

6.2.3 Wirkung an den Mitochondrien und weitere zelluläre Effekte von TH in HepG2 Zellen

Unter der Annahme, dass 3,5-T₂ transporterab- oder unabhängig die Plasmamembran passiert und intrazellulär keinem weitreichenden Metabolismus unterliegt, stellt die Aktivierung der Mitochondrien eine weitere Nachweis-Ebene der Aufnahme von 3,5-T₂ in die Zelle dar. Als

Positivkontrolle wurde T_3 verwendet. Es zeigte sich, dass die Stimulation der mitochondrialen Atmung durch T_3 nach akuter Applikation der Substanz erfolgreich war. Ein vergleichbarer Effekt blieb allerdings mit $3,5-T_2$ aus, selbst bei Verwendung höherer Konzentrationen. Daraus kann zuerst einmal geschlossen werden, dass unter den gleichen Versuchsbedingungen $3,5-T_2$ die Mitochondrien in HepG2-Zellen stimuliert im Gegensatz zu T_3 . Ob dies an der mangelnden Aufnahme in die Zelle liegt kann nur vermutet werden. Des Weiteren kann in HepG2 Zellen nicht sicher festgestellt werden, dass die T_3 Effekte nicht durch einen weiteren Metaboliten wie $3,5-T_2$ verursacht werden. In dem Fall würde T_3 als Shuttle über die Plasmamembran dienen, intrazellulär metabolisiert werden und dann als eigentlicher Effektor an den Mitochondrien wirksam werden.

Es zeigte sich, dass $3,5-T_2$ konzentrationsabhängig die extrazelluläre Akkumulation von Protonen stimuliert. Dieser Effekt konnte bei Verwendung von T_3 nicht nachgewiesen werden. Da diese Regulation bereits wenige Minuten nach $3,5-T_2$ Zugabe auftritt und nach weiteren Minuten bereits vermindert ist, kann vermutet werden, dass dieser Effekt an der Zelloberfläche verursacht wird und unabhängig von der $3,5-T_2$ -Aufnahme ist. In primären Hepatozyten von Hühnerembryonen wurde gezeigt, dass $3,5-T_2$ einen Na^+/H^+ -Antiporter an der Plasmamembran derart beeinflussen kann, dass es zu einem vermehrten Export von H^+ kommt (81, 82, 147). Die Wirkung des $3,5-T_2$ s auf den Antiporter war dabei nicht linear, sondern hatte eine glockenähnliche Verteilung. Der höchste H^+ -Transport nach extrazellulär wurde bei 1 nM erreicht, was nicht pharmakologisch ist. Die Veränderungen des pH-Wertes wurden ebenfalls über einen sehr kurzen Zeitraum von 15 min erhoben. Der zugrundeliegende Mechanismus schließt die Interaktion mit Integrinen, Aktivierung von MAPK und nachfolgend die Regulation des Antiporters mit ein (148). Die Frage bleibt aber unbeantwortet warum mit T_3 keine Aktivierung dieses Signalweges gezeigt werden konnte. Weitere direkte Experimente zur Klärung, ob der Na^+/H^+ -Antiporter wirklich in HepG2-Zellen den vermehrten $3,5-T_2$ stimulierten Flux von H^+ stimuliert wurde nicht weiter untersucht, da es nicht dem zu bearbeitenden Thema entsprach. Zusammenfassend konnte in HepG2 Zellen als intaktes hepatozelluläres System die gewünschte Aktivierung der Mitochondrien nicht nachgewiesen werden in Gegensatz zu plasmamembranvermittelten Effekten. Es ist demnach nicht das richtige Zellsystem für die gewünschte Fragestellung.

Die Alternative sind primäre isolierte Hepatozyten der Maus. Auf ein humanrelevantes Zellsystem muss dann aber verzichtet werden. Die Präparation primärer Hepatozyten für die Messung der mitochondrialen Atmung im Seahorse Bioanalyzer ist aufwendig verglichen mit der HepG2-Kultivierung. Je nach Güte der Präparation schwankt die basale Atmung bei gleicher Zellzahl. Um vergleichbare Effekte mit TH und TH-Metaboliten nachweisen zu können ist das allerdings Voraussetzung.

Aus den Untersuchungen kann geschlossen werden, dass nicht jede Zelllinie bzw. jedes hepatozelluläre Modell für alle Untersuchungen geeignet ist. Das trifft insbesondere dann zu, wenn zellulärer Energiestoffwechsel in intakten Zellen gemessen werden soll.

6.3 Immunoassay

6.3.1 Etablierung und Validierung

Im Rahmen dieser Promotion wurde ein mAb-basierter CLIA für die Quantifizierung von 3,5-T₂ im humanen Serum entwickelt. Dazu wurden in der Maus mAbs generiert, die hoch spezifisch 3,5-T₂ erkennen können. Der Immunoassay, der mit dem mAb 4F8 etabliert wurde, zeigte lediglich nennenswerte Kreuzreaktivitäten mit 3,5-T₂AM und 3,5-TA₂. Beide Substanzen wurden allerdings bis jetzt nicht in Serum von Mensch oder Tier nachgewiesen. Der Immunoassay zeigte ausserdem eine geringe Kreuzreaktivität mit T₃. Für den Kreuzreaktivitätstest wurde eine Konzentration eingesetzt, die 50-fach (100 nM) über der physiologischen T₃-Serumkonzentration liegt (2,1 nM). Es ist sehr unwahrscheinlich, selbst bei hyperthyreoten Patienten, dass es zu einer Interferenz der 3,5-T₂ Assay Performance durch T₃ Kreuzreaktivität kommt. In der Tat konnte ausserdem gezeigt werden, dass 3,5-T₂ Werte in hyperthyreoten Patienten nicht erhöht sind im Vergleich zu euthyreoten oder hypothyreoten Patienten. Dieser neu entwickelte Immunoassay misst zuverlässig 3,5-T₂ im Bereich 0,2 - 10,0 nM, mit einer Intraassay-Variabilität von 4,1-9,0 % und einer Interassay-Variabilität von 5,6-12,9 %.

6.2.1 a) Limitierungen des 3,5-T₂ CLIA

Während der Etablierung und Validierung wurde der Immunoassay hinsichtlich maximaler Sensitivität und Spezifität entwickelt. Dies hatte allerdings auch seine Grenzen. Das untere Detektionslimit ist bei 0,2 nM 3,5-T₂ festgelegt. Bei der Analyse der SHIP-TREND Studie hatten knapp 1/3 der Probanden 3,5-T₂ Serum Konzentrationen unterhalb des Detektionslimits. Es ist möglich eine Aussage dazu zu treffen, dass Werte < 0,2 nM verschieden von 0,0 und 0,1 nM sind. Jedoch ist eine Quantifizierung aufgrund der hohen Variation nicht zuverlässig. Demnach muss für die Festlegung eines Referenzbereiches (weitere SHIP-Probanden) die Sensitivität des Immunoassays weiter verbessert werden. Hinzu kommt, dass sowohl in der SHIP-Kohorte als auch in den dialysepflichtigen chronisch Nierenkranken Werte gemessen wurden, die weiter als die 2-fache Standardabweichung von dem Mittelwert entfernt waren und damit als statistische Ausreißer von den Berechnungen ausgeschlossen wurden. Der naheliegendste Grund ist, dass die Werte tatsächlich so hoch sind. Um dies festzustellen, wurden jene Proben der Nierenkranken > 10 nM 3,5-T₂ linear verdünnt und erneut im Assay vermessen. Für die SHIP-TREND Vermessung war dies aufgrund des geringen zur Verfügung gestellten Serumvolumens nicht möglich. Die lineare Verdünnung gelang jedoch nicht bei allen Proben, was dann dafür spricht, dass bei einigen Individuen etwas in der Serummatrix

vorhanden ist, was Assay-Interferenzen auslöst. Diesbezüglich müssen weitere Substanzen, Medikamente, TH-Metabolite (z. B. 3,5-T₂-Sulfat) auf ihre Störfähigkeit im Assay getestet werden. Dieses Verfahren ist dadurch limitiert, dass die Substanzen bekannt sein und zur Verfügung stehen müssen. Und selbst wenn Medikamente identifiziert werden, die interferieren ist man ausserdem darauf angewiesen Information über die Medikation bereit gestellt zu bekommen.

6.3.2 Vergleich Immunoassay und LC-MS/MS

Eine neu entwickelte Methode, wie der hier präsentierte 3,5-T₂-CLIA, wird standardmäßig gegen den etablierten „Goldstandard“ zur Bestimmung des untersuchten Analyten abgeglichen. Dies könnte in diesem Fall eine analytische Methode (LC-MS/MS) oder ein anderer Immunoassay (pAb basierter 3,5-T₂ RIA sein), ein wirklicher „Goldstandard“ ist jedoch nicht vorhanden. Für direkte Vergleichsmessungen stehen keine der damals im RIA benutzten pAb mehr zur Verfügung, da die Antiseren nicht mehr vorhanden oder die enthaltenen pAb nicht mehr intakt sind. Dem direkten Vergleich mit der Analytik von 3,5-T₂ in der LC-MS/MS mangelt es einerseits an einer publizierten Methode zum Nachweis des endogenen 3,5-T₂s in humanem Serum und andererseits an Informationen bezüglich 3,5-T₂-Proteinbindung im Serum. Es gibt keinerlei Informationen dazu, in welchem Ausmaß 3,5-T₂ an Serumproteine gebunden ist und in welchem Ausmaß diese Bindung die Messung des Analyten im CLIA beeinflusst. Da kein präanalytischer Schritte dem mAb-basierten CLIA vorgeschaltet ist, erwarten wir, dass die hohe Affinität des 3,5-T₂ mAb den Analyten effektiv bindet und mit der Bindung an mögliche Serumproteine kompetiert, so dass im Assay sowohl Protein-gebundenes als auch freies 3,5-T₂ quantifiziert wird. Diese Hypothese wird durch eine Anzahl von Versuchen zur 3,5-T₂ Detektion im humanen Serum mit analytischen Methoden wie LC-MS/MS bzw. ESI-MS/MS gestützt. Zhang *et al.* publizierten eine ESI-MS/MS-basierte Methode mit SPE-Säulen als offline präanalytische Präparation (98). Ihr etabliertes Protokoll funktionierte für TH-freies und prozessiertes Serum dem exogenes 3,5-T₂ zugesetzt wurde. Jedoch waren in der Publikation keine Daten integriert, die zeigten, dass ihre Methode sensitive genug ist um endogene 3,5-T₂ Konzentrationen im Serum zu messen. Piehl *et al.* veröffentlichten eine LC-MS/MS basierte Methode zur 3,5-T₂ -Separation von 3,3'-T₂ und 3',5'-T₂ in Zellkultur-basierten Versuchsansätzen (98). In einer Publikation wird deutlich gemacht, dass die entwickelte Methode nicht sensitive genug ist um endogene 3,5-T₂ Mengen im humanen Serum zu bestimmen, da diese unterhalb deren Detektionslimits sind (100). Die MS/MS-basierten analytischen Methoden könnten die Protein-gebundene Menge des Analyten auf der SPE-Säule während der Präanalytik verlieren. Ausserdem benötigen beide Methoden 0,5 ml Serum für eine Einzelbestimmung. Sowohl das Problem der Serumproteinbindung als auch das LC-MS/MS Detektionslimit werden durch die Verwendung eines hoch affinen mAb-basierten CLIA verhindert, da kein präanalytischer Schritt oder ein Protokoll zur

Anreicherung des Analyten aus dem Serum enthalten ist. Der CLIA benötigt 50 µl für die 3,5-T₂ Bestimmung im Duplikat, was 10-fach weniger Serum ist als für eine Einfachbestimmung mittels MS/MS-basierter Technologie ist. Die partielle Bindung des 3,5-T₂s an Proteine würde auch die publizierten Unterschiede in den 3,5-T₂ Konzentrationen verschiedener Assays erklären sowie die sehr gute Stabilität des Analyten bei der 24h Lagerung (4 °C oder RT statt -20 °C) und beim wiederholten Auftauen und wieder Einfrieren. Die Bindung von 3,5-T₂ an Serumproteine kann den Metaboliten vor weiteren Modifikationen durch z. B. Deiodasen schützen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein mAb hergestellt und mit ihm ein Immunoassay für die Detektion von 3,5-T₂ im humanen Serum etabliert. Mit dieser Methode soll weiterführend die Rolle des 3,5-T₂s im Serum und im Geweben des Menschen bzw. verschiedener Tierspezies untersucht werden. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit präsentierten Daten müssen weitere Untersuchungen zeigen für welche pathophysiologischen Bedingungen 3,5-T₂ ein geeigneter klinischer Biomarker ist.

6.3.3 3-T₁AM als 3,5-T₂-Metabolit?

Vor nicht allzu langer Zeit wurde ein mAb-basierter Lumineszenz-Immunoassay (LIA) für den Nachweis des 3-T₁AMs im humanen Serum (103) publiziert. Die Autoren konnten zeigen, dass auch 3-T₁AM in T₄-substituierten Schilddrüsenkrebspatienten erhöht ist im Vergleich zu einer euthyreoten Kontrollpopulation. Sie schlossen ebenfalls daraus, dass 3-T₁AM extrathyroidal aus dem bereitgestellten T₄ metabolisiert wird. Da 3,5-T₂ einer der möglichen Metabolismus-Vorläufer von 3-T₁AM ist, wurde versucht eine direkte Verbindung zwischen 3-T₁AM und 3,5-T₂ Werten im Serum herzustellen. Jedoch zeigten beide Parameter im selben Kollektiv der Schilddrüsenkrebs-Patienten keine Korrelation. Dies muss jedoch nicht bedeuten, dass es keinen Zusammenhang zwischen den beiden Metaboliten gibt, da lediglich Serum-Parameter betrachtet wurden. Die Korrelation zwischen beiden Parametern sollte in dem Organ wo die Deiodierung und Decarboxylierung stattfindet vorhanden sein.

6.3.4 Referenzbereich für 3,5-T₂ in einer euthyreoten Population

Vor Jahrzehnten halfen RIAs, welche pAb zur 3,5-T₂-Detektion von 3,5-T₂ benutzten, erste Daten zur Rolle von 3,5-T₂ im humanen Serum zu sammeln. Jedoch sind die zu der Zeit produzierten Daten zum Großteil kontrovers zu diskutieren da kein einheitliches Bild für 3,5-T₂ in thyroidalen und nicht-thyroidalen Erkrankungen gezeichnet werden konnte. Allein die Serum-Werte für 3,5-T₂ in euthyreoten Individuen variieren in der Literatur von $0,008 \pm 0,003$ nM bis zu $0,14 \pm 0,07$ nM, Werte die 15-fach höher liegen im Vergleich zu den niedrigsten Messdaten (92, 95, 96, 134, 149, 150). Mit dem hier beschriebenen mAb-basierten CLIA konnten in der SHIP-Studie Median-Serum-Konzentration von 0,24 nM (1. Quartil: 0,20 nM; 3. Quartile: 0,37 nM; n=761) bestimmt werden. Dies ist das erste bevölkerungsrepräsentative Datenset euthyreoter Individuen in denen 3,5-T₂ bestimmt

wurde. Trotzdem repräsentiert es noch keinen Referenzbereich für 3,5-T₂ Serumkonzentrationen, da die gemessene Stichprobe dafür zu klein ist. Obwohl ein direkter Vergleich sicherlich illusorisch ist so kann jedenfalls festgestellt werden, dass die hier präsentierten 3,5-T₂ Konzentrationen im gleichen Bereich der mit dem pAb am höchsten gemessenen 3,5-T₂-RIA-Serumwerte liegen. Der von mir entwickelte CLIA und die von mir durchgeführte Vermessung von 3,5-T₂ in der SHIP-TREND Studie bildete die Grundlage für weitreichende Assoziationsstudien in Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern. Im weiteren Verlauf wurden die 3,5-T₂-Daten umfangreich mit antropometrischen Daten, verschiedenen Metabolomen usw. assoziiert. Inwiefern sich daraus Kausalitäten ableiten lassen werden weitere Untersuchungen zeigen. In Tabelle 20 sind Assoziationsparameter zusammengefasst, die aus der 3,5-T₂-Bestimmung in der SHIP-Population hervor gingen. Die Zusammenhänge werden im Rahmen einer anderen Doktorarbeit ausführlich diskutiert und wurden bereits von uns publiziert oder sind im Reviewprozess.

Tabelle 20 Assoziation von 3,5-T₂ mit Biomarkern im Serum von euthyreoten SHIP-Probanden

Assoziation mit 3,5-T ₂	untersuchte Parameter	Referenz
Glukosestoffwechsel	Serum-Fastenglukose ↗, Urin-Trigonellin ↗	(136), VI
Lipidstoffwechsel	Leptin ↗ (TSH abhängig), Urin-Azeton ↗	(136), VI
Oxidativer Stress	Urin-Pyroglutamat ↗	VI
TH Stoffwechsel	TSH ↗	(136)
kardiovaskuläres Risiko	arterio-venöses Ratio ↘, Knöchel-Arm-Index	(151), IIX

↗ positiver Zusammenhang, ↘ indirekter Zusammenhang

6.3.5 3,5-T₂ im thyroidalen Erkrankungsbild

Unter Anwendung dieses neuen CLIAs konnte gezeigt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied in der 3,5-T₂ Serum Konzentration bei Patienten mit verschiedenen thyroidalen Dysfunktionen gibt (135). Basierend auf den fT₃- und fT₄-Werten der Patienten wurde bei ihnen Hypo- oder Hyperthyreose diagnostiziert (siehe Abb. 46). Es konnte in keiner der beiden Gruppen eine Korrelation zwischen den freien Schilddrüsenhormonen und dem gemessenen 3,5-T₂ nachweisen (Daten nicht gezeigt). Inwiefern 3,5-T₂ als ein Schilddrüsenhormonparameter im Serum zur Beurteilung von Schilddrüsenerkrankungen heran gezogen werden kann wird schon lange diskutiert. 1979 bereits zeigten Maciel *et al.* mit einem 3,5-T₂ RIA, dass es zwischen eu-, hypo- und hyperthyreoten Individuen keinerlei Unterschiede gibt (149). Wieder andere Gruppen publizierten, dass 3,5-T₂ Serumwerte signifikant erhöht sind in Patienten mit Hypertyreose und erniedrigt oder nicht verschieden von Euthyreoten bei diagnostizierter Hypothyreose (92, 96, 150). Schwächen der genannten Studien sind oft ungleiche Geschlechterverteilung (überwiegend Frauen) oder gar keine Angabe dazu. Die Anzahl weiblicher (23 hypo-, 19 hyperthyroid) und männlicher Patienten (8 hypo-,

5 hyperthyroid) ist in der vorliegenden Arbeit zumindest ausgeglichen zwischen den untersuchten Gruppen. Ein weiteres Problem der bisher mit dem 3,5-T₂ RIA untersuchten Kohorten ist die kleine N-Zahl der untersuchten Gruppen, was eine Extrapolation der beschriebenen Daten auf die Gesamtbevölkerung ausschließt. Oft liegen zudem zusätzlich zu primären Schilddrüsedefekt weitere Erkrankungen vor. Letztlich ist dadurch die Aussagekraft der Daten eingeschränkt. Hinzu kommt die geringe Vergleichbarkeit aller zu der Zeit verfügbaren Messmethoden mit ihren diversen Messbereichen.

In Patienten mit Schilddrüsenkrebs unter L-T₄ Supplementationstherapie zeigte sich (siehe Abb. 47), dass 3,5-T₂ Serum Konzentrationen signifikant erhöht sind im Vergleich zu einer Alters- und Geschlechtsangepassten euthyreoten Vergleichsgruppe. Die Kombination aus L-T₄-Supplementation und erhöhtem 3,5-T₂, gemessen in thyreodektomierten Patienten legt den Schluss nahe, dass 3,5-T₂ extrathyroidal durch Deiodasen in einem noch nicht bekannten Organ / Gewebe gebildet wird. Maciel *et al.* extrahierten Schilddrüsengewebe und vermaßen es im 3,5-T₂ RIA. Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zu T₄ der 3,5-T₂-Anteil verschwindend gering war (149). Lediglich 0,07 % der Thyreoglobulin-gebundenen TH war 3,5-T₂. Sie schlossen daraus, dass nur eine geringe 3,5-T₂-Menge direkt von der Schilddrüse produziert wird und wiesen ebenfalls darauf hin, dass der Umsatz durch extratyroidale Deiodasen sehr wahrscheinlich ist. Zusätzlich zu diesen Daten zeigten Faber *et al.* dass etwa 15 % des infundierten markierten T₃s extrathyroidal zu 3,5-T₂ umgesetzt wird (93).

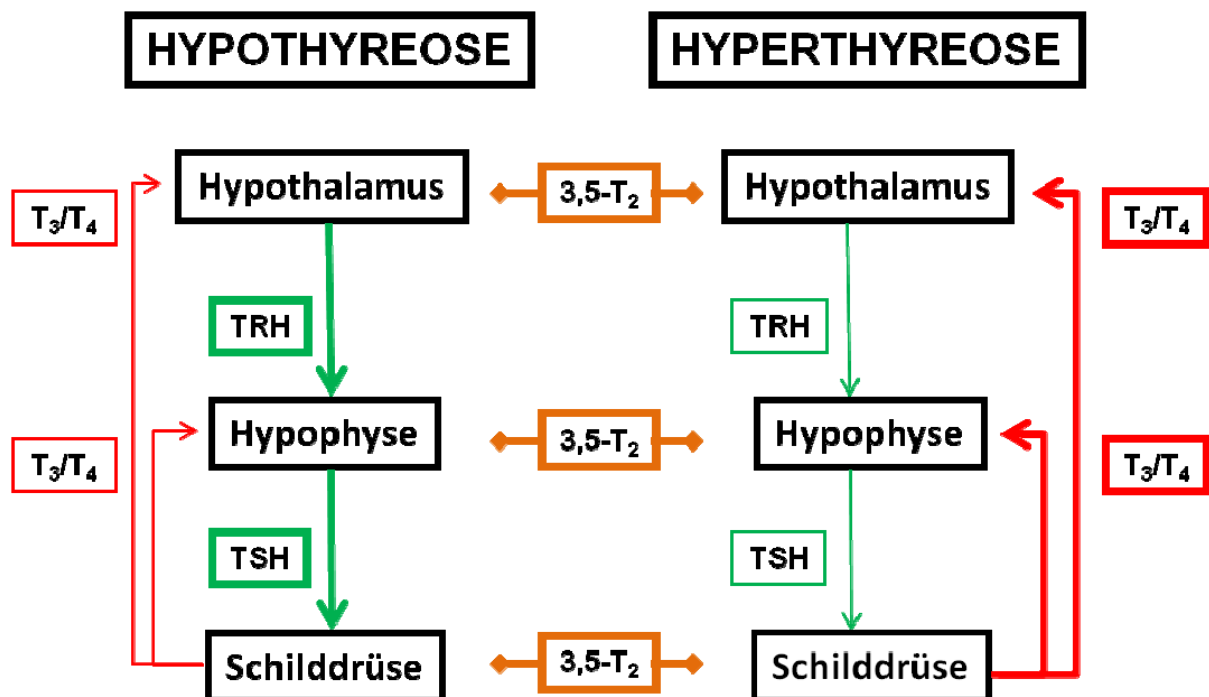


Abb. 46 Beteiligung des 3,5-T₂s an der Regulation der HPT-Achse

In der Hypothyreose sind T₃ und T₄-Konzentrationen in der Zirkulation aufgrund veränderter TH-Produktion in der SD und / oder Dio-Aktivität verringert. In Folge dessen sind TRH und TSH erhöht und stimulieren die TH-Produktion in der SD. In der Hyperthyreose sind diese beiden Parameter vermindert aufgrund der vermehrten T₃ / T₄ Rückkopplung auf Ebene des

Hypothalamus und der Hypophyse. 3,5-T₂ Serumkonzentrationen waren im Zustand der Hyper-/oder Hypothyreose nicht verändert, woraus geschlossen werden kann, dass dieser Metabolit nicht zur Regulation der HPT-Achse beiträgt.

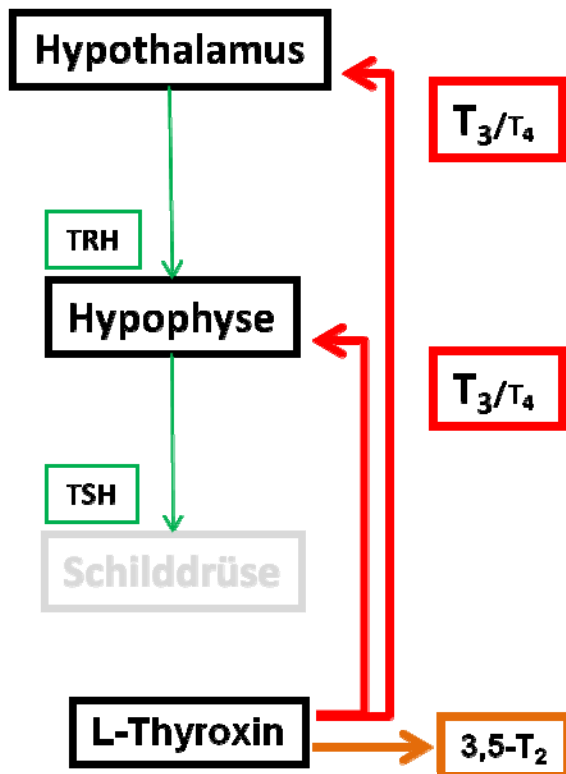


Abb. 47 Extrathyroidale 3,5-T₂-Bildung aus L-Thyroxin

Patienten mit Schilddrüsen Krebs wurden thyroidektomiert und postoperativ fortlaufend mit L-Thyroxin als protektive TSH-Suppression behandelt. 3,5-T₂ ist in der Zirkulation dieser Patienten vorhanden und sogar im Vergleich zu einer alters- und geschlechtsgleichen Kontrollgruppe erhöht. Daraus kann geschlossen werden, dass 3,5-T₂ nicht in der SD produziert wird, sondern extrathyroidal aus oral verabreichtem L-Thyroxin gebildet wird.

6.3.6 3,5-T₂ im nicht-thyroidalen Erkrankungsbild

Kritisch kranke Patienten weisen in der klinischen Diagnostik oft niedrige bis normale T₄-Werte, signifikant verringertes T₃ sowie erhöhte rT₃-Konzentrationen bei gleichzeitig unverändertem TSH auf. Die beschriebene Konstellation wird als „nonthyroidal illness syndrome“ (NTI), „sick euthyroid syndrome“ oder „low T₃ syndrome“ bezeichnet (152-156). Die Symptome sind eindeutig von primären und sekundären SD-Erkrankungen abgrenzbar. Problematisch ist, dass diese Patienten aufgrund ihres TSHs als euthyreot eingestuft werden, obwohl weitere TH-Parameter pathologisch verändert sind. Daran beteiligt sind Veränderungen in den zentralen sowie peripheren Steuersystemen des TH-Haushalts. In der Peripherie weisen TH eine geringere Bindung und Affinität an ihre Bindungsproteine auf. Ausserdem ist die organspezifische Expression von Transportern, Deiodasen und TH-Rezeptoren verändert. Es wird zwischen akutem und chronischem NTI unterschieden (Review siehe (157)).

6.3.6 a) Chronisches NTI bei dialysepflichtigen Patienten mit Niereninsuffizienz (CKD)

Die Prävalenz eine Hypothyreose zu entwickeln ist in Patienten mit CKD höher verglichen mit der Normalpopulation (158, 159). Die Wahrscheinlichkeit eine NTI zu bekommen stieg bei Patienten mit CKD in Abhängigkeit von der sinkenden glomerulären Filtrationsrate (GFR) an und liegt zwischen 20 und 80% (160-163). Damit ist das „low T_3 syndrome“ das am weitesten verbreitete Syndrom unter CKD Patienten. Die beschriebenen Auslenkungen in den TH kommen bei Patienten mit Hämodialyse und peritonealer Dialyse gleichermaßen vor (164-166). Hämodialyse-Patienten mit niedrigen T_3 - und T_4 -Werten haben eine erhöhte Sterblichkeitsrate, überwiegend durch Eintritt kardiovaskulärer Vorfälle (165). Die niedrigen TH normalisieren sich drei Monate nach erfolgreicher Nierentransplantation wieder, wobei anhaltende niedrige fT_3 -Werte Marker für eine fortdauernde Minderfunktion der Niere sind (167).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit NTI analysiert, die eine chronische Nierenerkrankung haben und aufgrund einer verringerten Filtrationsrate dialysepflichtig sind (Prof. J. Anselmo, Azoren, Portugal). Die Patienten zeigen eine Hypothyreose die klassisch mit erhöhten Serum-Kreatinin-Werten und einer verringerten GFR assoziiert ist (168-170).

Aufgrund des anhaltenden Schweregrades der Erkrankung über mehrere Jahre wird das NTI als chronisch eingestuft. Patienten, die über einen längeren Zeitraum (chronische Phase des NTI) Intensivbehandlung nötig haben, zeigen eine verringerte TRH Expression (171) und in Folge dessen sinkt TSH. Zusätzlich verschwindet die pulsatorische Ausschüttung des TSHs, was die TH-Produktion eingeschränkt (172). Die TSH-Werte in dem NTI-CKD-Patienten waren dagegen unverändert im Vergleich zu der internen nicht-dialysepflichtigen Kontrollpopulation. Es wird geschlussfolgert, dass es sich um eine mildere Form des chronischen NTI im Vergleich zu Patienten mit Intensivbehandlung handelt. Chronische NTI-Intensivpatienten entwickeln aufgrund der veränderte TRH und TSH Konzentrationen eine Hypothyreose. Die Prävalenz eine klinische oder subklinische Hypothyreose mit niedrigem T_3 zu entwickeln steigt ebenfalls mit dem Fortschreiten einer chronischen Nierenerkrankung. Die NTI-CKD Probanden zeigten signifikant verminderte fT_3 - und fT_4 -Werte, wobei erstere zum Großteil bereits unterhalb des angegebenen Referenzbereiches lagen. Im Rahmen eines klassischen (akuten) NTI kann rT_3 als T_4 -Metabolit erhöht sein (173). Dies konnte in dem untersuchten Kollektiv nicht bestätigt werden. Es ist dabei unklar ob nicht signifikante Veränderungen des TSHs und rT_3 s auf eine mildere Form des NTI hindeuten oder der chronische Verlauf diese Adaptation über die Zeit hervorgerufen hat. In der Niere wird T_4 durch lokale Dio1-Aktivität zu T_3 umgesetzt (30). Eine verringerte Dio1-Aktivität und Expression in Folge des NTI sowie die vermehrte Freisetzung von TH aus deren Bindungsproteinen kann das Fortschreiten der Erkrankung bedingen (158, 159, 173, 174). Diese beiden Regulationsmechanismen können in

NTI-CDK-Patienten die verringerten T_4/T_3 -Werte in der Zirkulation teilweise erklären. Das nephrotische Syndrom trägt ebenfalls zu sinkenden T_4/T_3 -Konzentrationen aufgrund erhöhter Ausscheidung Hormon-bindender Proteine, wie Albumin, Thyroxin-bindenden Globulin (TBG) und Transthyretin, mit dem Urin bei (175). Die Veränderungen der TH in der Zirkulation sind abhängig von dem Schweregrad der Albuminurie und den daraus resultierenden Albumin-Serum-Konzentrationen (175). Als neuer TH-Parameter wurde $3,5-T_2$ im CLIA untersucht. $3,5-T_2$ war massiv erhöht in dialysepflichtigen Patienten vor der Dialyse. Nach erfolgter Dialyse war $3,5-T_2$ in den Seren der meisten Probanden vermindert, jedoch immer noch signifikant erhöht im Vergleich zu der internen Kontrollgruppe. Die peripheren Organe reagieren unter Einfluss der Hypothyreose mit kompensatorischen Mechanismen. Es wird vermehrt MCT8 und Dio2 im Muskel exprimiert (176), die Dio2-Aktivität steigt (177). Es wird vermutet, dass Dio2 den Umsatz von T_3 zu $3,5-T_2$ katalysiert, wobei das Gewebe, wo dieser Umsatz stattfindet noch nicht bekannt ist. Aufgrund der hier präsentierten Daten kann vermutet werden, dass die erhöhte Dio2 Aktivität zu einer verminderten T_3 -Serumkonzentration aufgrund erhöhter $3,5-T_2$ -Bildung und -Akkumulation dieses Metaboliten beiträgt. Es wurde daher die Beziehung zwischen $3,5-T_2$ und fT_3 - sowie fT_4 -Konzentrationen als potenzielle Vorläufer-Substanzen untersucht. Lineare Korrelationen zeigten, dass niedrige fT_4 ($r^2=0,019$, $P=0,340$) sowie fT_3 -Werte ($r^2=0,144$, $P=0,007$) in direktem Zusammenhang mit steigenden $3,5-T_2$ -Konzentrationen stehen. Eine weitere Erklärung für die erhöhten $3,5-T_2$ -Konzentrationen im Serum ist die vermehrte Freisetzung aus seinen Bindungsproteinen, wie es für die anderen TH in diesem Krankheitsbild beschrieben ist. Die Bindungsproteine für $3,5-T_2$ im Serum sind allerdings bis jetzt unbekannt. Es ist weiterhin fraglich warum $3,5-T_2$ akkumuliert und vor allem zirkuliert. Möglich ist einerseits, dass es eine bestimmte Funktion erfüllt und deswegen angereichert wird. In Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten wirkte $3,5-T_2$ als protektiver Faktor und verhinderte die renale Gefäßzerstörung als Folge der diabetischen Nephropathie (178). Vor Kurzem erst wurde in einer TSH-auffälligen Subpopulation der SHIP-Studie gezeigt, dass mit dem $3,5-T_2$ Assay gemessene hohe $3,5-T_2$ Werte mit einem verminderten kardiovaskulären Risiko assoziiert sind (siehe Referenz VII und (151)). Es ist denkbar, dass $3,5-T_2$ lokal an der Niere schützend auf die Gefäße wirkt und so die fibrotischen Veränderungen in ihrer Ausbreitung eindämmt um die Nierenfunktion aufrecht zu erhalten. Um diesen Zusammenhang zu bestätigen sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

6.3.6 b) Akutes NTI in Patienten mit postoperativem atrialen Herzflimmern (POAF)

Die Ergebnisse dieser Studie (Dr. J.W. Dietrich, Bergmannsheil Universitätsklinikum Bochum) sollen aufgrund der 3,5-T₂ Untersuchungen mit dem neuen CLIA nur kurz vergleichend bezüglich des TH-Metabolismus (siehe Tabelle 21) erläutert, jedoch nicht ausführlich im Rahmen dieser Doktorarbeit beschrieben werden (siehe Referenz IV). Untersucht wurden Patienten mit normalem Sinus-Rhythmus (n=22) im Vergleich zu Patienten die ein POAF entwickelten (n=17). Getrennt davon wurden Patienten mit normaler Homeostase (n=30) und ausgeprägtem NTI (n=9) untersucht. 3,5-T₂ war in POAF- und NTI- Patienten signifikant erhöht (p < 0,05). In der Gruppe der POAF-Patienten zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen fT₃ sowie rT₃ und 3,5-T₂ (jeweils p < 0,05). Damit konnte in einer zweiten unabhängigen Kohorte mit NTI, aber anderem diagnostischen Hintergrund ebenfalls gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen verminderten fT₃-Werten und erhöhten 3,5-T₂-Konzentrationen in der Zirkulation gibt. Weitere kardiovaskuläre Untersuchungsergebnisse siehe Referenz IV.

Tabelle 21 TH-Parameter im Serum von Probanden ± POAF sowie ± NTI

3,5-T₂ und rT₃ wurden eigenständig im 3,5-T₂-CLIA und rT₃ RIA vermessen. Alle weiteren Daten wurden durch den Kooperationspartner erhoben und als Datensatz für die hier gezeigte Analyse zur Verfügung gestellt.

	Ohne POAF (n = 22)	POAF (n = 17)	p Value	Ohne NTI (n = 30)	NTI (n = 9)	p Value
Präoperative Laborparameter						
TSH (mIU/L)	1,10 ± 0,13	1,46 ± 0,19	n. s.	1,23 ± 0,14	1,35 ± 0,22	n. s.
fT ₄ (pmol/L)	11,7 ± 0,4	11,7 ± 0,3	n. s.	11,5 ± 0,2	12,3 ± 0,8	n. s.
fT ₃ (pmol/L)	5,0 ± 0,2	4,4 ± 0,1	<0,01	5,0 ± 0,1	3,9 ± 0,1	<1e-5
tT ₄ (nmol/L)	105 ± 3	104 ± 4	n. s.	101 ± 3	115 ± 3	<0,05
tT ₃ (nmol/L)	1,80 ± 0,09	1,53 ± 0,11	n. s.	1,80 ± 0,07	1,32 ± 0,15	<0,05
rT ₃ (nmol/L)	0,46 ± 0,02	0,50 ± 0,04	n. s.	0,47 ± 0,02	0,52 ± 0,03	n. s.
3,5-T ₂ (nmol/L)	0,37 ± 0,04	0,53 ± 0,06	<0,05	0,39 ± 0,04	0,59 ± 0,07	<0,05
fT ₃ /rT ₃	11,8 ± 0,9	8,7 ± 0,6	<0,05	11,5 ± 0,7	7,9 ± 0,6	<0,001
3,5-T ₂ /fT ₃	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,02	<0,05	0,08 ± 0,01	0,15 ± 0,02	<0,01
3,5-T ₂ /rT ₃	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	n. s.	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,2	n. s.

Als Ergebnis dieser Doktorarbeit konnte mit der 3,5-T₂-Bestimmung im humanen Serum erstmals ein neuer Serumparameter zur Klassifizierung und Beurteilung des NTI eingeführt werden. Es konnte in zwei Kollektiven mit völlig verschiedenen Grunderkrankungen gezeigt werden, dass verringerte T₃ und T₄ Werte in der Zirkulation, bei unverändertem TSH und rT₃, assoziiert sind mit signifikant

erhöhten 3,5-T₂ Werten. Die Bestimmung des 3,5-T₂s im humanen Serum kritisch kranker scheinbar euthyreoter Patienten stellt zusätzliche Informationen zur Dio-Aktivität/Expression bereit, besonders in jenen Zuständen, wo eine T₃/T₄-Hypothyreose nicht durch gestiegenes rT₃ erklärt werden kann. Mit der hier vorgestellten 3,5-T₂-Messmethode von können weitere Untersuchungen zur Bedeutung der 3,5-T₂-Anreicherung in der Zirkulation während verschiedenster Formen des NTI gesammelt und ergründet werden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

TH-Metabolite sind seit Jahren fester Bestandteil der Schilddrüsenhormon- und Energiestoffwechselforschung. Obwohl sich 3,5-T₂ und 3-T₁AM strukturell kaum von einander sowie von den klassischen TH T₃ und T₄ unterscheiden, so haben alle doch sehr unterschiedliche Wirkungen im Organismus.

Sowohl für 3,5-T₂ als auch für 3-T₁AM ist ein Zusammenhang mit Serumglukose (136) und HbA_{1c} (112) beschrieben, sowie eine kardiovaskulär-protective Wirkung für 3,5-T₂ (151, 178). Deshalb soll weiterhin analysiert werden ob diabetische Patienten mit und ohne Nephropathie, sowie chronisch nierenkranke Patienten ohne Diabetes Mellitus veränderte Serumkonzentrationen beider Metabolite haben. Es wird angenommen, dass sich daraus Rückschlüsse auf Schweregrad und Progression der Erkrankungen ergeben.

Es konnte zum ersten Mal *in vivo* nachgewiesen werden, dass 3-T₁AM durch Hemmung der ATP-Produktion zu einer Senkung der Insulinsekretion beiträgt. In diesem Kontext soll perspektivisch untersucht werden, ob 3-T₁AM bzw. TA₁ eine ähnliche regulatorische Funktion in pankreatischen α -Zellen haben, welche eine Hyperglucagonämie begünstigt. Da 3-T₁AM in der Leber auch die Glukoneogenese (121) stimuliert, was ebenfalls zu einer Hyperglykämie beiträgt, soll die Etablierung eines primären Hepatozyten-Zellmodells zur Untersuchung der substratspezifischen Energieverstoffwechslung voran getrieben werden. Dieses Modell steht dann ebenfalls für Untersuchungen der 3,5-T₂ Wirkung zur Verfügung. Für diese Versuche soll auch weiterhin der Seahorse XFe Bioanalyzer genutzt werden.

Viele Fragen bezüglich der 3,5-T₂ und 3-T₁AM Biosynthese sowie der physiologischen Serumkonzentrationen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Sowohl die Immunoassays als auch die LC-MS/MS Analytik sind gut dafür geeignet TH-Metabolite in Körperflüssigkeiten und Geweben zu bestimmen. Beide Methoden haben ihre Einschränkungen, die fortlaufend verbessert werden müssen. Heutzutage wird die LC-MS/MS Analytik in Forschungslaboren gerne als Goldstandard verwendet. Gerade für TH und TH-Metabolite ist die Etablierung einer Messmethode immernoch ausstehend, weil aufwändiger und komplexer als gedacht. Die klinische Routine verwendet deswegen für T₃ und T₄ immernoch Immunoassays.

Jedoch haben auch Immunoassays ihre Schwächen die kritisch betrachtet werden müssen. Ein knappes Drittel der vermessenen 3,5-T₂ Serumkonzentrationen der SHIP-TREND Studie lag unterhalb des Detektionslimits. Eine Quantifizierung in diesem Bereich ist wenig zuverlässig. Aufgrund dessen muss für weitere Messungen zur Etablierung eines Referenzbereiches die Sensitivität des 3,5-T₂ CLIA verbessert werden (< 0.2 nM).

Ebenfalls kritisch zu betrachten sind die enorm hohen Werten ($n=10$), welche in den dialysepflichtigen Probanden mit chronischer Niereninsuffizienz teilweise bestimmt wurden. Es konnten nicht alle Seren oberhalb 10 nM 3,5-T₂ linear verdünnt und anschließend zuverlässig quantifiziert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Befunde falsch-positiv sind. Dementsprechend muss nach Substanzen gesucht werden, die Interferenzen mit dem 3,5-T₂ CLIA verursachen können. Zusätzlich ist es sinnvoll weitere TH-Metabolite, die ebenfalls an Bedeutung gewinnen (N-Acetyl-3-T₁AM und 3,5-T₂-Sulfat) in den Immunoassays zu testen um heraus zu bekommen ob diese detektiert werden oder der jeweilige mAb spezifisch ist, so dass diese nicht erkannt werden.

Zudem ist der CLIA in seiner jetzigen Form nur für humanes Serum etabliert. Der 3-T₁AM Immunoassay wurde bereits so umstrukturiert, dass er speziesunabhängig, sensitiver und stabiler ist, was ebenfalls für den 3,5-T₂ CLIA angestrebt wird. Die Vermessung des 3,5-T₂s in Maus-Seren ist der nächste Schritt um die Bestimmung der TH-Metabolite einer breiteren Forschungsgemeinde zugänglich zu machen und damit den Wissenszuwachs voran zu bringen. Es gibt ausserdem weitere Vorversuche 3,5-T₂ und 3-T₁AM, in Speichel und Gewebe zu bestimmen bzw. in Immunopräzipitationen anzureichern.

Die Analyse der TH und TH-Metabolite in ausgewählten Kollektiven mit einer spezifischen Fragestellung kann in Kombination mit *in vitro* Zellkulturversuchen dazu beitragen Metabolismus, Wirkung sowie zugrundeliegende Mechanismen aufzuklären.

8. Referenzen

1. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N 2003 The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 24:48-77.
2. Dai G, Levy O, Carrasco N 1996 Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379:458-460.
3. Twyffels L, Strickaert A, Virreira M, Massart C, Van Sande J, Wauquier C, Beauwens R, Dumont JE, Galiotta LJ, Boom A, Kruys V 2014 Anoctamin-1/TMEM16A is the major apical iodide channel of the thyrocyte. *American journal of physiology Cell physiology:ajpcell* 00126 02014.
4. Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED 2000 Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 141:839-845.
5. Gillam MP, Sidhaye AR, Lee EJ, Rutishauser J, Stephan CW, Kopp P 2004 Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J Biol Chem* 279:13004-13010.
6. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F 2000 Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 275:23227-23233.
7. Ohye H, Sugawara M 2010 Dual oxidase, hydrogen peroxide and thyroid diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 235:424-433.
8. Taurog A, Dorris ML, Doerge DR 1996 Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 330:24-32.
9. Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noel-Hudson MS, Morand S, Agnangji D, Sezan A, Courtin F, Virion A, Dupuy C 2004 Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *Faseb J* 18:1574-1576.
10. Brix K, Linke M, Tepel C, Herzog V 2001 Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid. *Biological chemistry* 382:717-725.
11. Friedrichs B, Tepel C, Reinheckel T, Deussing J, von Figura K, Herzog V, Peters C, Saftig P, Brix K 2003 Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J Clin Invest* 111:1733-1745.
12. Yen PM 2001 Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews* 81:1097-1142.

13. Ekins R 1992 The free hormone hypothesis and measurement of free hormones. *Clinical chemistry* 38:1289-1293.
14. Mendel CM, Cavalieri RR, Weisiger RA 1988 Uptake of thyroxine by the perfused rat liver: implications for the free hormone hypothesis. *Am J Physiol* 255:E110-119.
15. Friesema ECH, Ganguly S, Abdalla A, Fox JEM, Halestrap AP, Visser TJ 2003 Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278:40128-40135.
16. Visser WE, Wong WS, van Mullem AAA, Friesema ECH, Geyer J, Visser TJ 2010 Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family. *Mol Cell Endocrinol* 315:138-145.
17. Friesema ECH, Docter R, Moerings EPCM, Verrey F, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ 2001 Thyroid hormone transport by the heterodimeric human system L amino acid transporter. *Endocrinology* 142:4339-4348.
18. van der Deure WM, Hansen PS, Peeters RP, Kyvik KO, Friesema ECH, Hegedus L, Visser TJ 2008 Thyroid hormone transport and metabolism by organic anion transporter 1C1 and consequences of genetic variation. *Endocrinology* 149:5307-5314.
19. Spangenberg DB 1971 Thyroxine induced metamorphosis in Aurelia. *The Journal of experimental zoology* 178:183-194.
20. Laurberg P 1984 Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. *Metabolism* 33:379-392.
21. Kohrle J 2000 The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 1:49-58.
22. Kohrle J 2002 Iodothyronine deiodinases. *Methods in enzymology* 347:125-167.
23. Kohrle J 2007 Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 21:173-191.
24. Bianco AC, Kim BW 2006 Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116:2571-2579.
25. Gereben B, Zeold A, Dentice M, Salvatore D, Bianco AC 2008 Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65:570-590.
26. Chopra IJ 1976 An assessment of daily production and significance of thyroidal secretion of 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T3) in man. *J Clin Invest* 58:32-40.

27. Solis SJ, Villalobos P, Orozco A, Valverde RC 2004 Comparative kinetic characterization of rat thyroid iodotyrosine dehalogenase and iodothyronine deiodinase type 1. *J Endocrinol* 181:385-392.
28. Chopra IJ, Solomon DH, Chopra U, Wu SY, Fisher DA, Nakamura Y 1978 Pathways of metabolism of thyroid hormones. *Recent progress in hormone research* 34:521-567.
29. Visser TJ 1994 Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chemico-biological interactions* 92:293-303.
30. Visser TJ 1996 Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta medica Austriaca* 23:10-16.
31. Wu SY, Green WL, Huang WS, Hays MT, Chopra IJ 2005 Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 15:943-958.
32. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR 2002 Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23:38-89.
33. Schweizer U, Weitzel JM, Schomburg L 2008 Think globally: act locally. New insights into the local regulation of thyroid hormone availability challenge long accepted dogmas. *Mol Cell Endocrinol* 289:1-9.
34. St Germain DL, Galton VA, Hernandez A 2009 Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* 150:1097-1107.
35. Piehl S, Hoefig CS, Scanlan TS, Kohrle J 2011 Thyronamines-Past, Present, and Future. *Endocr Rev* 32:64-80.
36. Saba A, Chiellini G, Frascarelli S, Marchini M, Ghelardoni S, Raffaelli A, Tonacchera M, Vitti P, Scanlan TS, Zucchi R 2010 Tissue Distribution and Cardiac Metabolism of 3-Iodothyronamine. *Endocrinology* 151:5063-5073.
37. Scanlan TS, Suchland KL, Hart ME, Chiellini G, Huang Y, Kruzich PJ, Frascarelli S, Crossley DA, Bunzow JR, Ronca-Testoni S, Lin ET, Hatton D, Zucchi R, Grandy DK 2004 3-iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med* 10:638-642.
38. Piehl S, Heberer T, Balizs G, Scanlan TS, Smits R, Kokschi B, Kohrle J 2008 Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases. *Endocrinology* 149:3037-3045.
39. Pietsch CA, Scanlan TS, Anderson RJ 2007 Thyronamines are substrates for human liver sulfotransferases. *Endocrinology* 148:1921-1927.
40. Wood WJL, Geraci T, Nilsen A, DeBarber AE, Scanlan TS 2009 Iodothyronamines are Oxidatively Deaminated to Iodothyroacetic Acids in vivo. *Chembiochem* 10:361-365.
41. Hoefig CS, Renk K, Piehl S, Scanlan TS, Bertoldi M, Opladen T, Hoffmann GF, Klein J, Blankenstein O, Schweizer U, Kohrle J 2012 Does the aromatic L-amino acid decarboxylase contribute to thyronamine biosynthesis? *Mol Cell Endocrinol* 349:195-201.

42. Manni ME, De Siena G, Saba A, Marchini M, Dicembrini I, Bigagli E, Cinci L, Lodovici M, Chiellini G, Zucchi R, Raimondi L 2012 3-Iodothyronamine: a modulator of the hypothalamus-pancreas-thyroid axes in mice. *Brit J Pharmacol* 166:650-658.
43. Balsam A, Sexton F, Borges M, Ingbar SH 1983 Formation of diiodotyrosine from thyroxine. Ether-link cleavage, an alternate pathway of thyroxine metabolism. *J Clin Invest* 72:1234-1245.
44. Kubota K, Uchimura H, Mitsuhashi T, Chiu SC, Kuzuya N, Ito K, Nagataki S 1985 Peroxidatic degradation and ether link cleavage of thyroxine in a particulate fraction of human thyroid. *Life sciences* 36:1033-1039.
45. Meinhold H, Beckert A, Wenzel KW 1981 Circulating diiodotyrosine: studies of its serum concentration, source, and turnover using radioimmunoassay after immunoextraction. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 53:1171-1178.
46. Meinhold H, Schwander J, Gramm HJ 1988 [Ether bond cleavage of thyroxine to diiodotyrosine (DIT). DIT in serum, a possible new marker of leukocyte activity in sepsis and severe infections]. *Acta medica Austriaca* 15 Suppl 1:25-30.
47. Wynn J, Gibbs R 1964 Thyroxine Degradation. Iv. The Product from the Beta-Phenyl Ring Following Incubation of Thyroxine with Microsomes. *J Biol Chem* 239:527-529.
48. Oetting A, Yen PM 2007 New insights into thyroid hormone action. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 21:193-208.
49. Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X 2006 Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol* 246:121-127.
50. Souza PC, Puhl AC, Martinez L, Aparicio R, Nascimento AS, Figueira AC, Nguyen P, Webb P, Skaf MS, Polikarpov I 2014 Identification of a new hormone-binding site on the surface of thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 28:534-545.
51. Kalyanaraman H, Schwappacher R, Joshua J, Zhuang S, Scott BT, Klos M, Casteel DE, Frangos JA, Dillmann W, Boss GR, Pilz RB 2014 Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor. *Science signaling* 7:ra48.
52. Davis PJ, Davis FB 1996 Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 6:497-504.
53. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, Davis PJ 2005 Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146:2864-2871.
54. Davis PJ, Davis FB, Lin HY, Mousa SA, Zhou M, Luidens MK 2009 Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 297:E1238-1246.

55. Davis FB, Tang HY, Shih A, Keating T, Lansing L, Hercbergs A, Fenstermaker RA, Mousa A, Mousa SA, Davis PJ, Lin HY 2006 Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer research* 66:7270-7275.
56. Anderson AB, Harington CR, Lyon DM 1933 The use of 3 : 5-diiodothyronine in the treatment of myx oe dema. *Lancet* 2:1081-1084.
57. Moreno M, de Lange P, Lombardi A, Silvestri E, Lanni A, Goglia F 2008 Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid* 18:239-253.
58. Cioffi F, Lanni A, Goglia F 2010 Thyroid hormones, mitochondrial bioenergetics and lipid handling. *Curr Opin Endocrinol* 17:402-407.
59. Lanni A, Moreno M, Lombardi A, de Lange P, Silvestri E, Ragni M, Farina P, Baccari GC, Fallahi P, Antonelli A, Goglia F 2005 3,5-Diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *Faseb J* 19:1552-+.
60. Lombardi A, de Lange P, Silvestri E, Busiello RA, Lanni A, Goglia F, Moreno M 2009 3,5-Diiodo-L-thyronine rapidly enhances mitochondrial fatty acid oxidation rate and thermogenesis in rat skeletal muscle: AMP-activated protein kinase involvement. *Am J Physiol-Endoc M* 296:E497-E502.
61. Moreno M, Silvestri E, De Matteis R, de Lange P, Lombardi A, Glinni D, Senese R, Cioffi F, Salzano AM, Scaloni A, Lanni A, Goglia F 2011 3,5-Diiodo-L-thyronine prevents high-fat-diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle through metabolic and structural adaptations. *Faseb J* 25:3312-3324.
62. de Lange P, Cioffi F, Senese R, Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, De Matteis R, Lionetti L, Mollica MP, Goglia F, Lanni A 2011 Nonthyrototoxic Prevention of Diet-Induced Insulin Resistance by 3,5-Diiodo-L-Thyronine in Rats. *Diabetes* 60:2730-2739.
63. Mollica MP, Lionetti L, Moreno M, Lombardi A, De Lange P, Antonelli A, Lanni A, Cavaliere G, Barletta A, Goglia F 2009 3,5-diiodo-L-thyronine, by modulating mitochondrial functions, reverses hepatic fat accumulation in rats fed a high-fat diet. *J Hepatol* 51:363-370.
64. Silvestri E, Cioffi F, Glinni D, Ceccarelli M, Lombardi A, de Lange P, Chambery A, Severino V, Lanni A, Goglia F, Moreno M 2010 Pathways affected by 3,5-diiodo-L-thyronine in liver of high fat-fed rats: Evidence from two-dimensional electrophoresis, blue-native PAGE, and mass spectrometry. *Mol Biosyst* 6:2256-2271.
65. Grasselli E, Voci A, Demori I, Canesi L, De Matteis R, Goglia F, Lanni A, Gallo G, Vergani L 2012 3,5-Diiodo-L-thyronine modulates the expression of genes of lipid metabolism in a rat model of fatty liver. *J Endocrinol* 212:149-158.

66. Lombardi A, Beneduce L, Moreno M, Diano S, Colantuoni V, Ursini MV, Lanni A, Goglia F 2000 3,5-diiodo-L-thyronine regulates glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the rats. *Endocrinology* 141:1729-1734.
67. Antonelli A FP, Ferrari SM, Di Domenicantonio A, Moreno M, Lanni A, Goglia F. 2011 3,5-diiodo-L-thyronine increases resting metabolic rate and reduces body weight without undesirable side effects. *J Biol Regul Homeost Agents*.
68. Giudetti AM, Leo M, Geelen MJH, Gnoni GV 2005 Short-term stimulation of lipogenesis by 3,5-L-diiodothyronine in cultured rat hepatocytes. *Endocrinology* 146:3959-3966.
69. Grasselli E, Voci A, Canesi L, De Matteis R, Goglia F, Cioffi F, Fugassa E, Gallo G, Vergani L 2011 Direct effects of iodothyronines on excess fat storage in rat hepatocytes. *J Hepatol* 54:1230-1236.
70. Horst C, Rokos H, Seitz HJ 1989 Rapid Stimulation of Hepatic Oxygen-Consumption by 3,5-Di-Iodo-L-Thyronine. *Biochem J* 261:945-950.
71. Lanni A, Moreno M, Cioffi M, Goglia F 1992 Effect of 3,3'-Diiodothyronine and 3,5-Diiodothyronine on Rat-Liver Oxidative Capacity. *Mol Cell Endocrinol* 86:143-148.
72. O'Reilly I, Murphy MP 1992 Treatment of hypothyroid rats with T2 (3,5-di-iodo-L-thyronine) rapidly stimulates respiration in subsequently isolated mitochondria. *Biochem Soc T* 20:59S.
73. Lanni A, Moreno M, Cioffi M, Goglia F 1993 Effect of 3,3'-Di-Iodothyronine and 3,5-Di-Iodothyronine on Rat-Liver Mitochondria. *J Endocrinol* 136:59-64.
74. Goglia F, Lanni A, Horst C, Moreno M, Thoma R 1994 In-Vitro Binding of 3,5-Di-Iodo-L-Thyronine to Rat-Liver Mitochondria. *J Mol Endocrinol* 13:275-282.
75. Arnold S, Goglia F, Kadenbach B 1998 3,5-diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur J Biochem* 252:325-330.
76. Kadenbach B, Arnold S 1999 A second mechanism of respiratory control. *Febs Lett* 447:131-134.
77. Kadenbach B 2003 Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1604:77-94.
78. Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Huttemann M 2004 The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1655:400-408.
79. Cavallo A, Gnoni A, Conte E, Siculella L, Zanotti F, Papa S, Gnoni GV 2011 3,5-Diiodo-L-Thyronine increases FoF1-ATP synthase activity and cardiolipin level in liver mitochondria of hypothyroid rats. *J Bioenerg Biomembr* 43:349-357.

80. Mangiullo R, Gnoni A, Damiano F, Siculella L, Zanotti F, Papa S, Gnoni GV 2010 3,5-diiodo-L-thyronine upregulates rat-liver mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by GA-binding protein/nuclear respiratory factor-2. *Bba-Bioenergetics* 1797:233-240.
81. Incerpi S, De Vito P, Luly P, Spagnuolo S, Leoni S 2002 Short-term effects of thyroid hormones and 3,5-diiodothyronine on membrane transport systems in chick embryo hepatocytes. *Endocrinology* 143:1660-1668.
82. Scapin S, Leoni S, Spagnuolo S, Fiore AM, Incerpi S 2009 Short-term effects of thyroid hormones on Na⁺-K⁺-ATPase activity of chick embryo hepatocytes during development: focus on signal transduction. *Am J Physiol-Cell Ph* 296:C4-C12.
83. Del Viscovo A, Secondo A, Esposito A, Goglia F, Moreno M, Canzoniero LM 2012 Intracellular and plasma membrane-initiated pathways involved in the [Ca²⁺]_i elevations induced by iodothyronines (T₃ and T₂) in pituitary GH3 cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 302:E1419-1430.
84. Moreno M, Silvestri E, Lombardi A, Visser TJ, Goglia F, Lanni A 2003 Identification of 3,5-diiodo-L-thyronine-binding proteins in rat liver cytosol by photoaffinity labeling. *Endocrinology* 144:2297-2303.
85. Ianculescu AG, Friesema ECH, Visser TJ, Giacomini KM, Scanlan TS 2010 Transport of thyroid hormones is selectively inhibited by 3-iodothyronamine. *Mol Biosyst* 6:1403-1410.
86. Horst C, Harneit A, Seitz HJ, Rokos H 1995 3,5-Di-Iodo-L-Thyronine Suppresses Tsh in Rats in-Vivo and in Rat Pituitary Fragments in-Vitro. *J Endocrinol* 145:291-297.
87. Baur A, Bauer K, Jarry H, Kohrle J 1997 3,5-diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5'deiodinase activity in rat anterior pituitaries in vivo and in reaggregate cultures and GH3 cells in vitro. *Endocrinology* 138:3242-3248.
88. Ball SG SJ, Chin WW. 1997 3,5-Diiodo-L-thyronine (T₂) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *J Mol Endocrinol*.
89. Mendoza A, Navarrete-Ramirez P, Hernandez-Puga G, Villalobos P, Holzer G, Renaud JP, Laudet V, Orozco A 2013 3,5-T-2 Is an Alternative Ligand for the Thyroid Hormone Receptor beta 1. *Endocrinology* 154:2948-2958.
90. Meinhold H, Schurnbrand P 1978 Radioimmunoassay for 3,5-Diiodothyronine. *Clin Endocrinol* 8:493-497.
91. Maciel RMB, Chopra IJ, Ozawa Y, Geola F, Solomon DH 1979 Radioimmunoassay for Measurement of 3,5-Diiodothyronine. *J Clin Endocr Metab* 49:399-405.
92. Engler D, Merkelbach U, Steiger G, Burger AG 1984 The Monodeiodination of Triiodothyronine and Reverse Triiodothyronine in Man - a Quantitative-Evaluation of the Pathway by the Use of Turnover Rate Techniques. *J Clin Endocr Metab* 58:49-61.

93. Faber J, Kirkegaard C, Lumholtz IB, Siersbaeknielsen K, Friis T 1982 Simultaneous Measurement of 3,5-Diiodothyronine and 3,5,3'-Triiodothyronine Turnover Kinetics in Euthyroid, Hyper-Thyroid, and Hypothyroid Subjects. *J Clin Endocr Metab* 55:8-12.
94. Nishikawa M, Inada M, Naito K, Ishii H, Tanaka K, Mashio Y, Imura H 1981 Age-Related-Changes of Serum 3,3'-Diiodothyronine, 3',5'-Diiodothyronine, and 3,5-Diiodothyronine Concentrations in Man. *J Clin Endocr Metab* 52:517-522.
95. Kirkegaard C, Faber J, Siersbaeknielsen K, Friis T 1981 A Radioimmunoassay of Serum 3,5-Diiodothyronine. *Acta Endocrinol-Cop* 97:196-201.
96. Pangaro L, Burman KD, Wartofsky L, Cahnmann HJ, Smallridge RC, Obrian JT, Wright FD, Latham K 1980 Radioimmunoassay for 3,5-Diiodothyronine and Evidence for Dependence on Conversion from 3,5,3'-Triiodothyronine. *J Clin Endocr Metab* 50:1075-1081.
97. Moreno M, Lombardi A, Beneduce L, Silvestri E, Pinna G, Goglia F, Lanni A 2002 Are the effects of T-3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T-3 itself? *Endocrinology* 143:504-510.
98. Piehl S, Heberer T, Balizs G, Scanlan TS, Kohrle J 2008 Development of a validated liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the distinction of thyronine and thyronamine constitutional isomers and for the identification of new deiodinase substrates. *Rapid Commun Mass Sp* 22:3286-3296.
99. Zhang YT, Conrad AH, Thoma R, Conrad GW 2006 Differentiation of diiodothyronines using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 41:162-168.
100. Wang DL, Stapleton HM 2010 Analysis of thyroid hormones in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 397:1831-1839.
101. Scanlan TS 2011 Endogenous 3-Iodothyronamine (T(1)AM): More Than We Bargained For. *J Clin Endocr Metab* 96:1674-1676.
102. Braulke LJ, Klingenspor M, DeBarber A, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Heldmaier G 2008 3-iodothyronamine: a novel hormone controlling the balance between glucose and lipid utilisation. *J Comp Physiol B* 178:167-177.
103. Hoefig CS, Kohrle J, Brabant G, Dixit K, Yap B, Strasburger CJ, Wu Z 2011 Evidence for Extrathyroidal Formation of 3-Iodothyronamine in Humans as Provided by a Novel Monoclonal Antibody-Based Chemiluminescent Serum Immunoassay. *J Clin Endocr Metab* 96:1864-1872.
104. Dhillon WS, Bewick GA, White NE, Gardiner JV, Thompson EL, Bataveljic A, Murphy KG, Roy D, Patel NA, Scutt JN, Armstrong A, Ghatei MA, Bloom SR 2009 The thyroid hormone derivative 3-iodothyronamine increases food intake in rodents. *Diabetes Obes Metab* 11:251-260.

105. Chiellini G, Frascarelli S, Ghelardoni S, Carnicelli V, Tobias SC, DeBarber A, Brogioni S, Ronca-Testoni S, Cerbai E, Grandy DK, Scanlan TS, Zucchi R 2007 Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function. *Faseb J* 21:1597-1608.
106. Zucchi R, Chiellini G, Frascarelli S, Camicelli V, Brogioni S, Ghelardoni S, Testoni S, Grandy DK, Cerbai E, Scanlan TS 2007 Modulation of cardiac inotropic state by 3-iodothyronamine: evidence for a novel signalling pathway mediated by trace amine-associated receptors. *Faseb J* 21:A246-A247.
107. Haviland JA, Reiland H, Butz DE, Tonelli M, Porter WP, Zucchi R, Scanlan TS, Chiellini G, Assadi-Porter FM 2013 NMR-based metabolomics and breath studies show lipid and protein catabolism during low dose chronic T(1)AM treatment. *Obesity* 21:2538-2544.
108. Cumero S, Fogolari F, Domenis R, Zucchi R, Mavelli I, Contessi S 2012 Mitochondrial FOF1-ATP synthase is a molecular target of 3-iodothyronamine, an endogenous metabolite of thyroid hormone. *Brit J Pharmacol* 166:2331-2347.
109. Venditti P, Napolitano G, Di Stefano L, Chiellini G, Zucchi R, Scanlan TS, Di Meo S 2011 Effects of the thyroid hormone derivatives 3-iodothyronamine and thyronamine on rat liver oxidative capacity. *Mol Cell Endocrinol* 341:55-62.
110. Regard JB, Kataoka H, Cano DA, Camerer E, Yin L, Zheng YW, Scanlan TS, Hebrok M, Coughlin SR 2007 Probing cell type-specific functions of G(i) in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion. *J Clin Invest* 117:4034-4043.
111. Klieverik LP, Foppen E, Ackermans MT, Serlie MJ, Sauerwein HP, Scanlan TS, Grandy DK, Fliers E, Kalsbeek A 2009 Central effects of thyronamines on glucose metabolism in rats. *J Endocrinol* 201:377-386.
112. Galli E, Marchini M, Saba A, Berti S, Tonacchera M, Vitti P, Scanlan TS, Iervasi G, Zucchi R 2012 Detection of 3-Iodothyronamine in Human Patients: A Preliminary Study. *J Clin Endocr Metab* 97:E69-E74.
113. Manni ME, De Siena G, Saba A, Marchini M, Landucci E, Gerace E, Zazzeri M, Musilli C, Pellegrini-Giampietro D, Matucci R, Zucchi R, Raimondi L 2013 Pharmacological effects of 3-iodothyronamine (T1AM) in mice include facilitation of memory acquisition and retention and reduction of pain threshold. *Brit J Pharmacol* 168:354-362.
114. Chiellini G, Erba P, Carnicelli V, Manfredi C, Frascarelli S, Ghelardoni S, Mariani G, Zucchi R 2012 Distribution of exogenous [¹²⁵I]-3-iodothyronamine in mouse in vivo: relationship with trace amine-associated receptors. *J Endocrinol* 213:223-230.
115. Roy G, Placzek E, Scanlan TS 2012 ApoB-100-containing Lipoproteins Are Major Carriers of 3-Iodothyronamine in Circulation. *J Biol Chem* 287:1790-1800.

116. Ianculescu AG, Giacomini KM, Scanlan TS 2009 Identification and Characterization of 3-Iodothyronamine Intracellular Transport. *Endocrinology* 150:1991-1999.
117. Panas HN, Lynch LJ, Vallender EJ, Xie ZH, Chen GL, Lynn SK, Scanlan TS, Miller GM 2010 Normal Thermoregulatory Responses to 3-iodothyronamine, Trace Amines and Amphetamine-like Psychostimulants in Trace Amine Associated Receptor 1 Knockout Mice. *J Neurosci Res* 88:1962-1969.
118. Soldin OP, Soldin SJ 2011 Thyroid hormone testing by tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry* 44:89-94.
119. Ackermans MT, Klieverik LP, Ringeling P, Endert E, Kalsbeek A, Fliers E 2010 An online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to study the presence of thyronamines in plasma and tissue and their putative conversion from C-13(6)-thyroxine. *J Endocrinol* 206:327-334.
120. Hackenmueller SA, Scanlan TS 2012 Identification and quantification of 3-iodothyronamine metabolites in mouse serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1256:89-97.
121. Ghelardoni S, Chiellini G, Frascarelli S, Saba A, Zucchi R 2014 Uptake and metabolic effects of 3-iodothyronamine in hepatocytes. *J Endocrinol* 221:101-110.
122. Agretti P, De Marco G, Russo L, Saba A, Raffaelli A, Marchini M, Chiellini G, Grasso L, Pinchera A, Vitti P, Scanlan TS, Zucchi R, Tonacchera M 2011 3-Iodothyronamine metabolism and functional effects in FRTL5 thyroid cells. *J Mol Endocrinol* 47:23-32.
123. Orsi G, Ghelardoni S, Saba A, Zucchi R, Vozzi G 2014 Characterization of 3-Iodothyronamine In Vitro Dynamics by Mathematical Modeling. *Cell Biochem Biophys* 68:37-47.
124. Miyazaki JI, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, Oka Y, Yamamura KI 1990 Establishment of a Pancreatic Beta-Cell Line That Retains Glucose-Inducible Insulin-Secretion - Special Reference to Expression of Glucose Transporter Isoforms. *Endocrinology* 127:126-132.
125. Lindl T 2002 *Zell- und Gewebekultur*. Vol 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
126. Mosmann T 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
127. Berridge MV, Tan AS 1993 Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303:474-482.

128. Denizot F, Lang R 1986 Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277.
129. Strasburger CJ, Wu Z, Pflaum CD, Dressendorfer RA 1996 Immunofunctional assay of human growth hormone (hGH) in serum: a possible consensus for quantitative hGH measurement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81:2613-2620.
130. Kohler G, Milstein C 1975 Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
131. Volzke H, Alte D, Schmidt CO, Radke D, Lorbeer R, Friedrich N, Aumann N, Lau K, Piontek M, Born G, Havemann C, Ittermann T, Schipf S, Haring R, Baumeister SE, Wallaschofski H, Nauck M, Frick S, Arnold A, Junger M, Mayerle J, Kraft M, Lerch MM, Dorr M, Reffellmann T, Empen K, Felix SB, Obst A, Koch B, Glaser S, Ewert R, Fietze I, Penzel T, Doren M, Rathmann W, Haerting J, Hannemann M, Ropcke J, Schminke U, Jurgens C, Tost F, Rettig R, Kors JA, Ungerer S, Hegenscheid K, Kuhn JP, Kuhn J, Hosten N, Puls R, Henke J, Gloger O, Teumer A, Homuth G, Volker U, Schwahn C, Holtfreter B, Polzer I, Kohlmann T, Grabe HJ, Roszkopf D, Kroemer HK, Kocher T, Biffar R, John U, Hoffmann W 2011 Cohort profile: the study of health in Pomerania. *International journal of epidemiology* 40:294-307.
132. Maechler P 2003 Novel regulation of insulin secretion: the role of mitochondria. *Curr Opin Investig Drugs* 4:1166-1172.
133. Cumero S, Contessi S, Zucchi R, Mavelli I 2010 3-iodothyronamine effect on membrane F0F1 ATPsynthase and soluble F1. *J Biotechnol* 150:S454-S454.
134. Chopra IJ, Sabatino L 2000 Nature and sources of circulating thyroid hormones. In: Braverman LE, Utiger RD, (eds). *Werner and Ingbar's The Thyroid*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
135. Lehmphul I, Brabant G, Wallaschofski H, Ruchala M, Strasburger CJ, Kohrle J, Wu Z 2014 Detection of 3,5-diiodothyronine in sera of patients with altered thyroid status using a new monoclonal antibody-based chemiluminescence immunoassay. *Thyroid* 24:1350-1360.
136. Pietzner M, Lehmphul I, Friedrich N, Schurmann C, Ittermann T, Dorr M, Nauck M, Laqua R, Volker U, Brabant G, Volzke H, Koehle J, Homuth G, Wallaschofski H 2014 Translating pharmacological findings from hypothyroid rodents to euthyroid humans: Is there a functional role of endogenous 3,5-T2? *Thyroid*.
137. Corcoran JM, Eastman CJ 1983 Radioimmunoassay of 3-L-monoiodothyronine: application in normal human physiology and thyroid disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 57:66-70.

138. Kaptein EM, Feinstein EI, Massry SG 1982 Thyroid hormone metabolism in renal diseases. *Contributions to nephrology* 33:122-135.
139. Iglesias P, Diez JJ 2009 Thyroid dysfunction and kidney disease. *Eur J Endocrinol* 160:503-515.
140. Friesema ECH, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MHA, Visser TJ 2008 Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol Endocrinol* 22:1357-1369.
141. Verga Falzacappa C, Panacchia L, Bucci B, Stigliano A, Cavallo MG, Brunetti E, Toscano V, Misiti S 2006 3,5,3'-triiodothyronine (T3) is a survival factor for pancreatic beta-cells undergoing apoptosis. *J Cell Physiol* 206:309-321.
142. Verga Falzacappa C, Patriarca V, Bucci B, Mangialardo C, Michienzi S, Moriggi G, Stigliano A, Brunetti E, Toscano V, Misiti S 2009 The TRbeta1 is essential in mediating T3 action on Akt pathway in human pancreatic insulinoma cells. *Journal of cellular biochemistry* 106:835-848.
143. Verga Falzacappa C, Mangialardo C, Raffa S, Mancuso A, Piergrossi P, Moriggi G, Piro S, Stigliano A, Torrisi MR, Brunetti E, Toscano V, Misiti S 2010 The thyroid hormone T3 improves function and survival of rat pancreatic islets during in vitro culture. *Islets* 2:96-103.
144. Kounnis V, Ioachim E, Svoboda M, Tzakos A, Sainis I, Thalhammer T, Steiner G, Briasoulis E 2011 Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B3, 1B1, and 1A2 in human pancreatic cancer reveals a new class of potential therapeutic targets. *OncoTargets and therapy* 4:27-32.
145. Roy G, Scanlan T 2010 Apolipoprotein B-100: A 3-iodothyronamine (T1AM) binding protein. *Abstr Pap Am Chem S* 240.
146. Rochira A, Damiano F, Marsigliante S, Gnoni GV, Siculella L 2013 3,5-Diiodo-L-thyronine induces SREBP-1 proteolytic cleavage block and apoptosis in human hepatoma (Hepg2) cells. *Bba-Mol Cell Biol L* 1831:1679-1689.
147. Scapin S, Leoni S, Spagnuolo S, Gnocchi D, De Vito P, Luly P, Pedersen JZ, Incerpi S 2010 Short-term effects of thyroid hormones during development: Focus on signal transduction. *Steroids* 75:576-584.
148. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB 2008 Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in neuroendocrinology* 29:211-218.
149. Maciel RM, Chopra IJ, Ozawa Y, Geola F, Solomon DH 1979 A radioimmunoassay for measurement of 3,5-diiodothyronine. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 49:399-405.
150. Pinna G, Meinhold H, Hiedra L, Thoma R, Hoell T, Graf KJ, StoltenburgDidinger G, Eravci M, Prengel H, Brodel O, Finke R, Baumgartner A 1997 Elevated 3,5-diiodothyronine

- concentrations in the sera of patients with nonthyroidal illnesses and brain tumors. *J Clin Endocr Metab* 82:1535-1542.
151. Ittermann T, Dorr M, Volzke H, Tost F, Lehmpfuhl I, Kohrle J, Jurgens C 2014 High serum thyrotropin levels are associated with retinal arteriolar narrowing in the general population. *Thyroid* 24:1473-1478.
 152. Utiger RD 1980 Decreased extrathyroidal triiodothyronine production in nonthyroidal illness: benefit or harm? *The American journal of medicine* 69:807-810.
 153. Wartofsky L, Burman KD 1982 Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: the "euthyroid sick syndrome". *Endocr Rev* 3:164-217.
 154. Van den Berghe GH 1998 Acute and prolonged critical illness are two distinct neuroendocrine paradigms. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie* 60:487-518; discussion 518-420.
 155. Boelen A, Kwakkel J, Fliers E 2011 Beyond low plasma T3: local thyroid hormone metabolism during inflammation and infection. *Endocr Rev* 32:670-693.
 156. Boonen E, Van den Berghe G 2014 Endocrine responses to critical illness: novel insights and therapeutic implications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99:1569-1582.
 157. Van den Berghe G 2014 Non-Thyroidal Illness in the ICU: A Syndrome with Different Faces. *Thyroid* 24:1456-1465.
 158. Lo JC, Chertow GM, Go AS, Hsu CY 2005 Increased prevalence of subclinical and clinical hypothyroidism in persons with chronic kidney disease. *Kidney international* 67:1047-1052.
 159. Chonchol M, Lippi G, Salvagno G, Zoppini G, Muggeo M, Targher G 2008 Prevalence of subclinical hypothyroidism in patients with chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 3:1296-1300.
 160. Kaptein EM 1996 Thyroid hormone metabolism and thyroid diseases in chronic renal failure. *Endocr Rev* 17:45-63.
 161. Carrero JJ, Qureshi AR, Axelsson J, Yilmaz MI, Rehnmark S, Witt MR, Barany P, Heimbürger O, Suliman ME, Alvestrand A, Lindholm B, Stenvinkel P 2007 Clinical and biochemical implications of low thyroid hormone levels (total and free forms) in euthyroid patients with chronic kidney disease. *Journal of internal medicine* 262:690-701.
 162. Song SH, Kwak IS, Lee DW, Kang YH, Seong EY, Park JS 2009 The prevalence of low triiodothyronine according to the stage of chronic kidney disease in subjects with a normal thyroid-stimulating hormone. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24:1534-1538.

163. Ozen KP, Asci G, Gungor O, Carrero JJ, Kircelli F, Tatar E, Sevinc Ok E, Ozkahya M, Toz H, Cirit M, Basci A, Ok E 2011 Nutritional state alters the association between free triiodothyronine levels and mortality in hemodialysis patients. *American journal of nephrology* 33:305-312.
164. Lin YC, Lin YC, Chen TW, Yang WC, Lin CC 2012 Abnormal thyroid function predicts mortality in patients receiving long-term peritoneal dialysis: a case-controlled longitudinal study. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* 75:54-59.
165. Meuwese CL, Dekker FW, Lindholm B, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Stenvinkel P, Carrero JJ 2012 Baseline levels and trimestral variation of triiodothyronine and thyroxine and their association with mortality in maintenance hemodialysis patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 7:131-138.
166. Dumler F, Bello MJ, Cruz C, Gotaas KA, Macks H 1995 Thyroid function surveillance in CAPD patients. *Advances in peritoneal dialysis Conference on Peritoneal Dialysis* 11:225-228.
167. Reinhardt W, Misch C, Jockenhovel F, Wu SY, Chopra I, Philipp T, Reinwein D, Eigler FW, Mann K 1997 Triiodothyronine (T3) reflects renal graft function after renal transplantation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46:563-569.
168. Kreisman SH, Hennessey JV 1999 Consistent reversible elevations of serum creatinine levels in severe hypothyroidism. *Archives of internal medicine* 159:79-82.
169. Mooraki A, Broumand B, Neekdoost F, Amirmokri P, Bastani B 2003 Reversible acute renal failure associated with hypothyroidism: report of four cases with a brief review of literature. *Nephrology* 8:57-60.
170. Karanikas G, Schutz M, Szabo M, Becherer A, Wiesner K, Dudczak R, Kletter K 2004 Isotopic renal function studies in severe hypothyroidism and after thyroid hormone replacement therapy. *American journal of nephrology* 24:41-45.
171. Fliers E, Guldenaar SE, Wiersinga WM, Swaab DF 1997 Decreased hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in patients with nonthyroidal illness. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82:4032-4036.
172. Van den Berghe G, de Zegher F, Veldhuis JD, Wouters P, Gouwy S, Stockman W, Weekers F, Schetz M, Lauwers P, Bouillon R, Bowers CY 1997 Thyrotrophin and prolactin release in prolonged critical illness: dynamics of spontaneous secretion and effects of growth hormone-secretagogues. *Clin Endocrinol (Oxf)* 47:599-612.
173. Peeters RP, Wouters PJ, Kaptein E, van Toor H, Visser TJ, Van den Berghe G 2003 Reduced activation and increased inactivation of thyroid hormone in tissues of critically ill patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:3202-3211.

174. Lim VS, Passo C, Murata Y, Ferrari E, Nakamura H, Refetoff S 1984 Reduced triiodothyronine content in liver but not pituitary of the uremic rat model: demonstration of changes compatible with thyroid hormone deficiency in liver only. *Endocrinology* 114:280-286.
175. Feinstein EI, Kaptein EM, Nicoloff JT, Massry SG 1982 Thyroid function in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *American journal of nephrology* 2:70-76.
176. Mebis L, Paletta D, Debaveye Y, Ellger B, Langouche L, D'Hoore A, Darras VM, Visser TJ, Van den Berghe G 2009 Expression of thyroid hormone transporters during critical illness. *Eur J Endocrinol* 161:243-250.
177. Mebis L, Langouche L, Visser TJ, Van den Berghe G 2007 The type II iodothyronine deiodinase is up-regulated in skeletal muscle during prolonged critical illness. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:3330-3333.
178. Shang GG, Gao P, Zhao ZH, Chen Q, Jiang T, Zhang N, Li H 2013 3,5-Diiodo-L-thyronine ameliorates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bba-Mol Basis Dis* 1832:674-684.

Eigene Publikationen

- I. **Detection of 3,5-diiodothyronine in sera of patients with altered thyroid status using a new monoclonal antibody based chemiluminescence immunoassay;** I. Lehmphul, G. Brabant, H. Wallaschofski, M. Ruchala, C. J. Strasburger, J. Köhrle, Z. Wu; Thyroid September 2014
- II. **Translating pharmacological findings from hypothyroid rodents to euthyroid humans: Is there a functional role of endogenous 3,5-T2?**; M. Pietzner*, I. Lehmphul*, N. Friedrich, C. Schurmann, T. Ittermann, M. Dörr, M. Nauck, R. Laqua, U. Völker, G. Brabant, H. Völzke, J. Köhrle, G. Homuth*, H. Wallaschofski*; Thyroid Oktober 2014
- III. **High serum thyrotropin levels are associated with retinal arteriolar narrowing in the general population;** T. Ittermann, M. Dörr, H. Völzke, F. Tost, I. Lehmphul, J. Köhrle, C. Jürgens; Thyroid Oktober 2014
- IV. **NTIS in cardiac illness involves elevated concentrations of 3,5-T2 and correlates to atrial remodelling;** J.W. Dietrich*, P. Müller*, F. Schiedat, M. Schlömicher, J. Strauch, A. Chatzitomaris, H.H. Klein, A. Mügge, J. Köhrle, E. Rijntjes, I. Lehmphul; (eingereicht)
- V. **Putative pathway of intestinal 3-Iodothyronamine biosynthesis;** C.S. Hoefig, T. Wunsch, I. Lehmphul, H. Daniel, U. Schweizer, J. Mittag, J. Köhrle; (in Revision)
- VI. **Urine metabolomics by 1H-NMR spectroscopy indicates associations between serum 3,5-T2 concentrations and intermediary metabolism in euthyroid humans;** M. Pietzner, G. Homuth, K. Budde, I. Lehmphul, U. Völker, H. Völzke, M. Nauck, J. Köhrle, N. Friedrich; (eingereicht)
- VII. **High TSH is Associated with Aortic Wall Thickness in the General Population;** T. Ittermann, R. Lorbeer, M. Dörr, T. Schneider, A. Quadrat, L. Heßelbarth, M. Wenzel, I. Lehmphul, J. Köhrle, B. Mensel*, H. Völzke*; (eingereicht)
- IIX. **Serum Thyrotropin Levels are not Associated with the Ankle-Brachial Index – Results from Three Population-Based Studies;** T. Ittermann, R. Lorbeer, D. Tiller, I. Lehmphul, A. Kluttig, S.B. Felix, K. Werdan, K.H. Greiser, J. Köhrle, H. Völzke, M. Dörr; (eingereicht)

*gleichberechtigte Autorenschaft

Danksagung

Mein herzlichster Dank geht zuerst an meinen Projektbetreuer und Leiter des Instituts für Experimentelle Endokrinologie Prof. Dr. Josef Köhrle. Seine Tür stand für mich immer offen und in den zahlreichen Gesprächen konnte ich von seinem enormen Wissen profitieren. Seine Fähigkeit Daken kritisch zu hinterfragen hat mich motiviert und voran gebracht.

Prof. Dr. Werner Kloas danke ich herzlich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit.

Besonders danken möchte ich auch dem Graduiertenkolleg 1208. Zahlreichen Aus- und Weiterbildungsmöglichkeiten halfen mir die Doktorarbeit Schritt für Schritt voran zu bringen und mich als Wissenschaftler individuell weiter zu entwickeln. Als Doktorand im Verbund des Graduiertenkollegs konnte ich von dem Zusammengehörigkeitsgefühl und dem gegenseitigen Austausch unter den Doktoranden sehr profitieren. Ich möchte auch den Mentoren, und Betreuern für die netten Gespräche und guten Ratschläge, sowie deren Hilfsbereitschaft und Interesse an meinem Thema danken.

Am Institut für Experimentelle Endokrinologie möchte ich mich recht herzlich bei allen Kollegen für die tolle Zusammenarbeit und die angenehmen Stunden im und ausserhalb des Labors bedanken. Für die großartige Hilfe und Unterstützung bei den Experimenten möchte ich dabei besonders Anja Fischbach und Kristin Fischer hervorheben. Meinen jetzigen und ehemaligen Mitdoktoranden danke ich für die tolle kollegiale Stimmung, Unterstützung bei allen anfallenden Problemen sowie die zahlreichen hilfreichen Ratschläge. Bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern Dr. Eddy Rijntjes, Dr. Carolin Höfig, Dr. Eva Wirth, Dr. Kostja Renko möchte ich mich für die inspirierenden fachlichen Gespräche, die aufmunternden Worte und die sehr angenehme Zusammenarbeit über die Zeit danken.

Im endokrinologischen Forschungslabor Carité-Mitte möchte ich mich einerseits bei Prof. Dr. Christian Strasburger für die fachliche Unterstützung und Bereitstellung des Labors bedanken. Andererseits gilt mein herzlichster Dank dem Laborleiter und meinem zweiten Mentor Dr. Zida Wu. Die Zusammenarbeit mit ihm hat maßgeblich zum Gelingen der Promotion beigetragen, was für mich mit einem konstanten Wissenszuwachs auf seinem Fachgebiet verbunden war. Des Weiteren möchte ich mich bei Sabine Kaiser sowie der ehemaligen Doktorandin Franziska Götsch für die sehr angenehme Atmosphäre im Labor und die heiteren Stunden im Büro bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und Freunden bedanken, die immer für mich da waren, mich motiviert, aufgemuntert und unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Zelluläre Wirkung, Wirkmechanismen und Nachweisverfahren von Schilddrüsenhormonen und ihren Metaboliten“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Des Weiteren erkläre ich meine Kenntnisnahme der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe und dass ich nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades bin.

Berlin, den

.....

Ina Lehmphul